

明治大学大学院農学研究科

2014 年度

博士学位請求論文

乳製品に応用される乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* SBT2171 及び

*Lactobacillus gasseri* SBT2055 の免疫調節機能に関する研究

A study on immunomodulatory effects of lactic acid bacteria used for dairy products:

*Lactobacillus helveticus* SBT2171 and *Lactobacillus gasseri* SBT2055

学位請求者 生命科学専攻

細谷 知広

本博士学位請求論文は、下記の原著論文をもとに作成された。

1. Hosoya T, Ogawa A, Sakai F, Kadooka Y (2012) A cheese-containing diet modulates immune responses and alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. J Dairy Sci 95: 2810-2818. doi: 10.3168/jds.2011-4763.
2. Hosoya T, Sakai F, Yamashita M, Shiozaki T, Endo T, *et al.* (2014) *Lactobacillus helveticus* SBT2171 inhibits lymphocyte proliferation by regulation of the JNK signaling pathway. PLoS One 9: e108360. doi: 10.1371/journal.pone.0108360.
3. Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, *et al.* (2014) *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF- $\beta$  expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. PLoS One 9: e105370. doi: 10.1371/journal.pone.0105370.

## 目次

緒言	1
第1章 <i>Lactobacillus helveticus</i> SBT2171 を使用して製造したチーズの免疫調節機能及び大腸炎緩和作用	
1-1. 序論	9
1-2. 実験材料及び方法	10
1-2-1. マウス	
1-2-2. 試薬及び抗体	
1-2-3. 飼料	
1-2-4. 動物実験	
1-2-5. 細胞分離	
1-2-6. 細胞培養	
1-2-7. FCM 解析	
1-2-8. サイトカイン測定	
1-2-9. 統計解析	
1-3. 結果	15
1-3-1. チーズが健常マウスの免疫系に与える影響	
1-3-2. チーズによる DSS 誘発大腸炎の緩和作用	
1-3-3. チーズが DSS 誘発大腸炎マウスの免疫系に与える影響	
1-4. 考察	17
1-5. 図表	22

第 2 章	<i>Lactobacillus helveticus</i> SBT2171 によるリンパ球の増殖抑制作用及びその 制御機構	
2-1.	序論	28
2-2.	実験材料及び方法	29
2-2-1.	乳酸菌	
2-2-2.	マウス	
2-2-3.	試薬及び抗体	
2-2-4.	細胞分離	
2-2-5.	細胞培養	
2-2-6.	細胞増殖試験	
2-2-7.	細胞周期の解析	
2-2-8.	ウェスタンブロッティング	
2-2-9.	動物実験	
2-2-10.	統計解析	
2-3.	結果	35
2-3-1.	LH2171 によるリンパ球の増殖抑制作用	
2-3-2.	LH2171 は BJAB 細胞の細胞周期の進行を抑制する	
2-3-3.	LH2171 は BJAB 細胞の JNK シグナルを抑制して CDC2 の発現を 抑制する	
2-3-4.	LH2171 によるコラーゲン誘発関節炎の緩和作用	
2-4.	考察	38
2-5.	図表	41

第3章 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 による IgA 抗体産生誘導作用及びその制御  
機構

3-1. 序論	49
3-2. 実験材料及び方法	50
3-2-1. 乳酸菌	
3-2-2. マウス	
3-2-3. 試薬及び抗体	
3-2-4. 動物実験	
3-2-5. 細胞分離	
3-2-6. FCM 解析	
3-2-7. パイエル板細胞からの CD11c <sup>+</sup> 細胞の除去及び脾細胞からの B 細胞 の分離	
3-2-8. 骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の調製	
3-2-9. 細胞培養	
3-2-10. RNA 抽出とリアルタイム PCR	
3-2-11. 抗体及びサイトカインの測定	
3-2-12. 統計解析	
3-3. 結果	58
3-3-1. LG2055 は小腸において IgA 抗体産生を誘導する	
3-3-2. LG2055 による IgA 抗体産生誘導には樹状細胞が重要である	
3-3-3. LG2055 による IgA 抗体産生誘導に関与する因子	
3-3-4. IgA 抗体産生誘導因子の産生には TGF- $\beta$ が必要である	
3-3-5. LG2055 は TLRs を介して IgA 抗体産生を誘導する	

3－4．考察	62
3－5．図表	68
総括	75
謝辞	81
参考文献	82

## 緒言

プロバイオティクスは、「十分な量を摂取すれば宿主の健康に有益な効果をもたらす生きた微生物」である [1]。最も代表的なプロバイオティクスは乳酸菌やビフィズス菌であり、ヨーグルトや乳酸飲料などの食品や生菌製剤に応用されている。乳酸菌は、代謝により乳酸を生成することを特徴とする嫌気性細菌であり、古くから乳製品や漬け物などの発酵食品の製造に利用されている。乳酸菌には、乳酸により腸の蠕動運動を活発にする整腸作用や、大腸菌などの有害菌の増殖を抑えて腸内細菌叢を改善する作用があることが知られている。さらに、最近の研究から、乳酸菌による腸内細菌叢の改善が、宿主の免疫系の発達や恒常性の維持に関与していることが明らかになりつつある [2-5]。ヒトの腸管には、約 1,000 種類、総数 100 兆個にも及ぶ細菌が生息して腸内細菌叢を形成している。腸管粘膜は、腸内細菌叢だけでなく、食事と共に摂取されるウイルスや病原性細菌にも常に曝されており、これらの感染から身を守るために、腸管には全身のリンパ球の 60%以上から構成される腸管免疫系が発達している。免疫系の恒常性の維持には、病原性微生物に対する防御応答と、食品や自己抗原に対する免疫寛容のバランスが保たれていることが重要である。このバランスが崩壊してしまうと、炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease; IBD）や関節リウマチ（rheumatoid arthritis; RA）などの慢性炎症を伴う自己免疫疾患が発症する原因となる。

IBD は、腸の粘膜に炎症や潰瘍を生じる炎症性疾患であり、下痢、腹痛、血便及び発熱などの症状がみられる。潰瘍性大腸炎及びクローン病が IBD の 2 大疾患であり、近年、その罹患率の増加が問題になっている [6]。若年層を中

心に発症する原因不明の難治性の疾患であり、日本では特定疾患（難病）に指定されている。日本における IBD 患者数は欧米に比べて少なかったが、近年、急速に増加している。IBD の原因は不明であるが、高脂肪、高糖質、低食物繊維といった食の欧米化が一因であることが指摘されている [6, 7]。また、最近の研究から、腸内細菌叢の細菌種の構成の異常（dysbiosis）が IBD の発症に関与していることも指摘されている [8]。IBD の根本的な治療法は確立されておらず、一般的には薬物療法が用いられている。しかし、薬物療法には副作用があることが問題になっている。また、IBD は寛解（症状が良くなること）と再燃（症状が悪くなること）を繰り返す疾患であり、治療が長期に渡るため、医療費が高額になることも問題になっている。

RA は、関節の滑膜に炎症を生じ、それが進行すると関節の変形が起きる炎症性疾患である。慢性的な関節炎や関節機能の低下により、RA 患者の生活の質（QOL）は著しく低下する。日本における RA 患者数は 60～70 万人であり、高齢化に伴い増加する傾向にある。30～50 才代に多く発症し、全患者数に占める女性の割合が男性の約 4 倍であり、女性に多い疾患である。RA の治療法としては、薬物療法、手術療法及びリハビリテーションなどが挙げられるが、一般的には薬物療法が用いられている。近年、RA の薬物療法において、抗 TNF 抗体や抗 IL-6 受容体抗体などの生物学的製剤の使用が導入され、その高い有効性が期待されている。しかし、生物学的製剤は従来薬剤に比べて高額であり、副作用があることも問題になっている。

IBD の動物モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発大腸炎や、RA の動物モデルであるコラーゲン誘発関節炎（CIA）を用いた検討において、



乳酸菌がこれらの自己免疫疾患の緩和に効果を示すことが報告されている

[9-14]。そのため、比較的安価で副作用の少ない自己免疫疾患の治療法として、乳酸菌の有用性が期待されている [15]。しかし、乳酸菌による自己免疫疾患の緩和効果については、その多くが動物モデルでの報告であり、詳細な制御機構についても不明である。

乳酸菌は、腸内細菌叢を改善するだけでなく、宿主の獲得免疫系及び自然免疫系と相互作用して、免疫調節機能を発揮することが知られている [16]。乳酸菌による獲得免疫系へ作用の 1 つに、ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) の応答への調節作用がある。Th 細胞は、ウイルスや病原性細菌の感染防御応答などの「正」の免疫応答を担う Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞と、それらの Th 細胞の過剰な応答を抑制する「負」の免疫応答を担う制御性 T 細胞 (Treg 細胞) のサブセットに分類される。Th1 細胞は、マクロファージや細胞傷害性 T 細胞などを活性化することで細胞性免疫応答に関与し、Th2 細胞は、B 細胞からの抗体産生を誘導することで液性免疫応答に関与する。Th1 細胞及び Th2 細胞は、互いの応答を抑制し合う関係にあり、Th2 細胞の過剰な応答は、アレルギー疾患の発症に関与することが知られている。ある種の乳酸菌は、Th1 細胞の応答を増強することで Th2 細胞の過剰な応答を抑制し、アレルギー疾患を緩和することが報告されている [17-19]。また、乳酸菌によるアレルギー疾患の緩和に Treg 細胞の誘導が関与していることも報告されている [20, 21]。Treg 細胞は、インターロイキン-10 (interleukin-10; IL-10) 及びベータ型トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor- $\beta$ ; TGF- $\beta$ ) を産生し、自己抗原に対する免疫応答の抑制や他の Th 細胞の過剰な応答の抑制に特化した Th 細胞

である [22, 23]。Treg 細胞は、転写因子 forkhead box protein P3 (Foxp3) を特異的に発現しており、Foxp3 の発現が Treg 細胞の分化及びその抑制機能に必須である [24, 25]。また、Treg 細胞は、IL-17 を産生する Th 細胞のサブセットである Th17 細胞と互いの応答を抑制し合う関係にあり、ナイーブ T 細胞からの分化過程においても互いの分化を抑制することが知られている [26, 27]。Th17 細胞は、健常時には、細胞外増殖性の細菌への感染防御応答に関与している。しかし、Th17 細胞の過剰な応答は、IBD や RA などの自己免疫疾患の発症に関与することが知られている [28]。そのため、Treg 細胞の誘導は、アレルギー疾患の緩和だけでなく、IBD や RA などの自己免疫疾患の緩和にも有効であると考えられ、Treg 細胞を誘導する乳酸菌は、自己免疫疾患の緩和に有効である可能性がある。一方、最近の研究から、ある種の乳酸菌及びその菌体成分が、*in vitro* において T 細胞や B 細胞などのリンパ球の活性化及び増殖を直接的に抑制することが報告されている [29-31]。Th17 細胞と、自己抗原に対する抗体を産生する B 細胞は、IBD や RA などの自己免疫疾患の病態形成において中心的な役割を果たすことが知られている [28, 32]。そのため、これらのリンパ球の過剰な活性化及び増殖を選択的に抑制する免疫抑制剤を開発することが、自己免疫疾患の緩和及び治療において重要な課題になっている。リンパ球の活性化及び増殖を担う細胞内シグナル伝達経路には、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen-activated protein kinase; MAPK) ファミリーや、核内因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$  B; NF- $\kappa$ B) などのシグナルが関与する [33, 34]。MAPK ファミリーの内、T 細胞の増殖には、細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase; ERK) 及び c-Jun N 末端キナー

ゼ（c-jun N-terminal kinase; JNK）シグナルが必要であることが報告されている [35, 36]。また、B 細胞の増殖には、ERK 及び p38 MAPK（p38）シグナルが必要であることが報告されている [37, 38]。しかし、乳酸菌が、これらのシグナルにどのような影響を与えてリンパ球の活性化及び増殖を抑制しているのかは明らかになっていない。

乳酸菌には自然免疫系を活性化させて感染防御能を増強するものも報告されている [39, 40]。これらの乳酸菌は、ウイルス感染細胞に対して強い細胞傷害活性を示すナチュラルキラー（NK）細胞を活性化する。また、ウイルス感染時に多量の I 型のインターフェロン（interferon; INF）を産生する形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid dendritic cell）を活性化させる乳酸菌も報告されている [41]。一方で、乳酸菌による感染防御能の増強作用として、IgA 抗体産生の誘導作用も知られている [42-46]。IgA 抗体は、体内で最も多量に産生される免疫グロブリンのアイソタイプであり、ヒトの腸管内では 1 日当たり約 3 g の IgA 抗体が産生されている [47, 48]。腸内で産生される IgA 抗体は、病原性微生物の腸管上皮細胞への付着及び感染を阻止し、細菌由来毒素を中和する機能がある [49]。免疫グロブリンの中で IgA 抗体のみの産生が減少するヒトの IgA 欠損症の患者は、多くが無症状であるが、慢性的な感染症の発症がみられることがある [50]。腸内細菌叢は、小腸のパイエル板と呼ばれるリンパ小節と腸間膜脂肪の腸間膜リンパ節と呼ばれるリンパ節群から構成される腸管関連リンパ組織（gut associated lymphoid tissues; GALT）を恒常的に刺激し、IgA 抗体産生を誘導する [51-54]。無菌状態で飼育し、腸内細菌叢をもたないマウスでは、腸管の IgA 産生が著しく低下していることが知られている。腸

内細菌叢と GALT との相互作用においては、樹状細胞が中心的な役割を果たしている [55]。腸管の樹状細胞は、TGF- $\beta$ 、IL-6、IL-10、a proliferation-inducing ligand (APRIL)、B cell activating factor (BAFF) 及びレチノイン酸などを産生することで、IgA 抗体産生の誘導に関与する [56-58]。GALT における IgA 抗体産生誘導では、パイエル板において、樹状細胞と T 細胞の作用により、IgM 陽性 B 細胞から IgA 陽性 B 細胞への IgA クラススイッチが誘導される。IgA クラススイッチは腸管免疫系の大きな特徴であり、脾臓や末梢リンパ節などの全身免疫系においては、IgM 陽性 B 細胞から IgG 陽性 B 細胞へのクラススイッチが誘導される。パイエル板で誘導された IgA 陽性 B 細胞は、循環血液中へと遊走した後に腸管の粘膜固有層にホーミングし、そこで IgA 産生形質細胞に分化して IgA 抗体を産生する。産生された IgA 抗体は、上皮細胞を介して腸管内腔へと分泌される。しかし、乳酸菌が、腸管での IgA 抗体産生を誘導する詳細な制御機構については不明である。

*Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*) SBT2171 (LH2171) は、*L. helveticus* の基準株である *L. helveticus* JCM1120<sup>T</sup> (LH1120T) を含む *L. helveticus* 28 菌株の中で、最もプロテアーゼ活性の高い菌株として選抜された乳酸菌である [59]。その後の研究により、LH2171 の高いプロテアーゼ活性は、LH2171 に特異的な複数のプロテアーゼに由来していることが分かっている [60, 61]。この高いプロテアーゼ活性を利用して、LH2171 はゴーダチーズと呼ばれる半硬質系のナチュラルチーズの製造に使用されている。ナチュラルチーズは、哺乳類の乳に乳酸菌を添加して乳酸の生成により pH を低下させ、レンネットと呼ばれる凝乳酵素を添加して乳を凝固させた後、様々な微生物による発酵及び熟成工

程を経て製造される乳製品である。チーズ中には発酵及び熟成のために添加された乳酸菌、プロピオン酸菌、カビ及び酵母などの微生物が含まれており、また、発酵及び熟成工程において様々な乳タンパク質由来のペプチド及び乳脂肪由来の脂肪酸が生成されることから、チーズには様々な健康機能が期待される。チーズの健康機能としては、高血圧改善作用、血中脂質改善作用、内臓脂肪蓄積抑制作用などがこれまでに報告されている[62-64]。これらの作用の多くが、発酵及び熟成工程において生成された乳タンパク質由来のペプチドに由来することが知られている。一方で、チーズの摂取が免疫系にどのような影響を与えるのかは、よく知られていない。また、チーズの製造に使用される乳酸菌の免疫調節機能を検討した報告は少ない。

*Lactobacillus gasseri* (*L. gasseri*) SBT2055 (LG2055) は、ヒトの糞便から単離された乳酸菌であり、プロバイオティクスとしてヨーグルトに使用されている。LG2055 は、胆汁酸耐性をもち、生きてヒトの腸管に定着することで、糞便中の *Staphylococcus* 属細菌（ブドウ球菌）の割合及び腸内の有害物質である p-クレゾールの濃度を低下させることが報告されている[65-67]。また、LG2055 の健康機能としては、ヒトの血中コレステロール低下作用 [68]、ヒト及びラットの内臓脂肪蓄積抑制作用がこれまでに報告されている [69-71]。LG2055 の免疫調節機能としては、先行研究において、マウスのインフルエンザウイルス感染を予防することが報告されている [72]。また、母マウスに LG2055 を摂取させると、母乳中の IgA 抗体量が増加し、仔マウスのロタウイルス感染が抑制されることが報告されている [73]。このことから、LG2055 の摂取は、

腸管において IgA 抗体産生を誘導し、宿主の感染防御能を増強する可能性が考えられる。

本研究では、チーズやヨーグルトなどの乳製品に応用されている乳酸菌の免疫調節機能を明らかにし、さらにその詳細な制御機構を解明することを目的として、以下のような研究を行った。第 1 章では、LH2171 を使用して製造したチーズの摂取が、免疫系にどのような影響を与えるのかを、健常マウス及び DSS 誘発大腸炎マウスにおいて検討した。第 2 章では、チーズの製造に使用した LH2171 の菌体自体に免疫調節機能があるのか否かを明らかにするため、自己免疫疾患や炎症などの過剰な免疫応答にみられるリンパ球の増殖に対して LH2171 の菌体がどのような影響を与えるのかを検証し、その制御機構についても検討した。また、LH2171 の菌体の免疫調節機能が生体内でも発揮されるのか否かを、CIA マウスを用いて検証した。第 3 章では、プロバイオティクスである LG2055 の免疫調節機能として、腸管での IgA 抗体産生の誘導作用を検証し、その制御機構についても検討した。

## 第 1 章 *Lactobacillus helveticus* SBT2171 を使用して製造したチーズの免疫調節機能及び大腸炎緩和作用

### 1 - 1 . 序論

LH2171 は、プロテアーゼ活性の高い菌株として選抜された乳酸菌であり [59]、高いプロテアーゼ活性を利用してナチュラルチーズの製造に使用されている。ナチュラルチーズは、有史以前からの長い歴史をもつ発酵乳製品であり、その製造において様々な微生物による発酵及び熟成という工程を経る。チーズ中には発酵及び熟成のために添加された乳酸菌が含まれており、また、発酵及び熟成工程において様々な乳タンパク質由来のペプチド及び乳脂肪由来の脂肪酸が生成されることから、チーズには様々な健康機能が期待される。一方、チーズの摂取が宿主の免疫系にどのような影響を与えるのかを検討した報告は少ない。そこで、本研究では、LH2171 を使用して製造したチーズの摂取が、免疫系にどのような影響を与えるのかを、健常マウスを用いて検討した。検討では、全身免疫系組織の脾臓及び腸管免疫系組織のパイエル板を対象とし、それぞれの組織におけるサイトカイン産生と Treg 細胞の割合を評価した。サイトカイン産生については、Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞及び Treg 細胞のそれぞれが特徴的に産生する、INF- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 及び IL-10 を対象として評価した。また、ヒトの IBD の動物モデルである DSS 誘発大腸炎マウス [74] を用いて、LH2171 を使用して製造したチーズの摂取が腸管の炎症応答にどのような影響を与えるのかを検討した。さらに、脾臓及びパイエル板を対象として、それぞれの組織における炎症性サイトカイン (IL-6 及び IL-17) 及び抗炎

症性サイトカイン（IL-10 及び TGF- $\beta$ 1）の産生と Treg 細胞の割合を評価し、LH2171 を使用して製造したチーズの摂取が DSS 誘発大腸炎マウスの免疫系にどのような影響を与えるのかを検討した。

## 1－2．実験材料及び方法

### 1－2－1．マウス

C57BL/6J マウス（雄、5 週齢）は、日本チャールス・リバー（神奈川、日本）より購入し、AIN-76 飼料（American Institute of Nutrition）と脱イオン水を 1 週間自由摂取させて馴化させた。マウスはステンレス製のゲージ内で、室温  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50\pm 10\%$ 、12 時間毎の明暗条件下で飼育した。全ての動物実験は、NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（National Research Council）に従って実施した。

### 1－2－2．試薬及び抗体

デキストラン硫酸ナトリウム（DSS、分子量：36,000～50,000）は、MP Biomedicals（OH, USA）より購入した。RPMI 1640、非働化ウシ胎仔血清（FBS）、HEPES、L-グルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンは、Invitrogen（CA, USA）より購入した。2-メルカプトエタノール及びアジ化ナトリウムは、和光純薬工業（大阪、日本）より購入した。Fluorescein isothiocyanate（FITC）標識抗マウス CD4 抗体（clone: L3T4）、Phycoerythrin（PE）標識抗マウス／ラット Foxp3 抗体（clone: FJK-16s）及び抗マウス CD16/CD32 抗体（Fc ブロック）は、eBioscience（CA, USA）より購入した。



### 1－2－3．飼料

AIN-76 飼料を基本にして、チーズ配合飼料と対照飼料を作製した。各飼料の組成を Table. 1 に示す。チーズは、プロテアーゼ活性の高い乳酸菌である *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LH2171) [59-61] を使用して製造したチーズ（雪印メグミルク、東京、日本）を使用した。チーズをミンチ状に破碎して凍結乾燥した後、フードプロセッサーを用いて粉末にした。得られたチーズ凍結乾燥粉の成分分析を行い、飼料中のタンパク質が 20%、脂質が 19.4%になるようにチーズ凍結乾燥粉を 43.9%配合した。対照飼料は、カゼインを 20%、ラードを 17.3%、コーン油を 2.1%（脂質としてラードとコーン油を合わせて 19.4%）配合した。主要ミネラルのナトリウム、リン、カルシウム、マグネシウム、リン酸及び鉄の組成は、Table. 1 に示した無機化合物を添加し、チーズ配合飼料と対照飼料で差がないように調節した。

### 1－2－4．動物実験

#### 試験 1：健常マウスへのチーズ摂取試験

C57BL/6J マウス（雄、6 週齢）20 匹を、平均体重がほぼ等しくなるように 10 匹ずつ対照群とチーズ摂取群の 2 群に分けた。対照群には対照飼料を、チーズ摂取群にはチーズ配合飼料を自由摂取させた。飲用水は両群共に脱イオン水を自由摂取させた。5 週間の摂取期間後、全てのマウスを麻酔下で屠殺して解剖し、脾臓とパイエル板を摘出した。

#### 試験 2：DSS 誘発大腸炎マウスへのチーズ摂取試験

C57BL/6J マウス（雄、6 週齢）30 匹を、平均体重がほぼ等しくなるように

10 匹ずつ無処置群、対照群、チーズ摂取群の 3 群に分けた。無処置群と対照群には対照飼料を、チーズ摂取群にはチーズ配合飼料を自由摂取させた。飲用水は全群に脱イオン水を自由摂取させた。5 週間の摂取期間後、対照群とチーズ摂取群の飲用水を 2% DSS 水溶液に切り替え、7 日間自由摂取させて大腸炎を誘発させた (day 0～day 7) [74]。無処置群には継続して脱イオン水を自由摂取させた。DSS 投与期間中も無処置群と対照群には対照飼料を、チーズ摂取群にはチーズ配合飼料を自由摂取させた。DSS 投与開始日より、体重、飼料摂取量及び摂水量を毎日測定した。Day 0, 1, 3, 5, 7 に便の性状と血便の状態を観察した。大腸炎の重症度は、Mchenga らの方法に従って、disease activity index (DAI) スコアを算出して評価した [75]。すなわち、大腸炎症状である体重減少、下痢、血便の 3 項目を、0～4 の 5 段階でスコア化し、その合計を DAI スコアとした。DAI スコアは大腸炎が最も重篤な場合で 12 となる。DSS 投与開始から 7 日後 (day 7) に全てのマウスを麻酔下で屠殺して解剖し、大腸、脾臓、パイエル板を摘出した。大腸炎の重症度を判定するため、盲腸から肛門までの大腸の全長を測定した。また、解剖時には腹部大静脈より採血を行った。得られた血液から遠心分離により血清を回収し、サイトカインの測定まで -80℃ で保存した。

#### 1 - 2 - 5 . 細胞分離

脾臓及びパイエル板を細胞培養培地 (1× RPMI 1640、10% FBS、10 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、0.05 mM 2-メルカプトエタノール) 中ですり潰し、70-µm セルストレイナー (BD

Bioscience, CA, USA) を通して、それぞれの細胞分散液を得た。脾細胞の分散液中に含まれる赤血球は、Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada) を用いた密度勾配遠心により除去した。細胞は細胞培養培地で 2 回洗浄した後、細胞培養培地に再分散させて、培養及びフローサイトメトリー (FCM) 解析まで氷中で保持した。

#### 1 - 2 - 6 . 細胞培養

脾細胞及びパイエル板細胞を細胞培養培地に分散し、 $2.5 \times 10^5$  cells/well の密度で 96-well 細胞培養用プレート (旭テクノグラス、東京、日本) に播いた。各ウェルに細胞と同数の抗 CD3/CD28 抗体ビーズ (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) を加えて刺激した (37°C、5% CO<sub>2</sub>、48~72 時間)。刺激後に培養上清を回収し、サイトカイン測定まで -80°C で保存した。

#### 1 - 2 - 7 . FCM 解析

脾細胞及びパイエル板細胞中の制御性 T (Treg) 細胞を検出するため、細胞表面の CD4 と細胞内の Foxp3 を染色した。細胞を FCM buffer (1× PBS、1% FBS、0.05% アジ化ナトリウム) で 2 回洗浄した後、FITC 標識抗マウス CD4 抗体 (0.25 µg/1×10<sup>6</sup> cells) と抗マウス CD16/CD32 抗体 (0.5 µg/1×10<sup>6</sup> cells) を加え、4°C で 30 分間反応させた。細胞を FCM buffer で洗浄した後、1× fixation/permeabilization buffer (eBioscience) を加えて細胞の透過及び固定処理を 4°C で O/N 実施した。細胞を 1× permeabilization buffer (eBioscience) で 2 回洗浄した後、PE 標識抗マウス/ラット Foxp3 抗体 (1 µg/1×10<sup>6</sup> cells) を加

え、4℃で30分間反応させた。細胞を1× permeabilization buffer で2回洗浄した後、EPICS XL フローサイトメーター (Beckman Coulter, CA, USA) を用いて解析した。得られたデータは CXP ソフトウェア (Beckman Coulter) により解析した。

#### 1-2-8. サイトカイン測定

培養上清及び血清中の IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、INF- $\gamma$  (BD Bioscience) 及び TGF- $\beta$ 1 (R&D Systems, MN, USA) は、ELISA キットを用いて測定した。培養上清中の TGF- $\beta$ 1 の測定は、キットの説明書に従ってサンプルを酸処理した後に行った。マウスの TGF- $\beta$ 1 と細胞培養培地の FBS に含まれるウシ TGF- $\beta$ 1 とに交差性があるため、細胞培養培地中の TGF- $\beta$ 1 の測定値をサンプルの測定値から差し引いた。

#### 1-2-9. 統計解析

測定データは平均値±標準偏差で示している。検定は StatView ソフトウェア (SAS Institute, NC, USA) を用いて t 検定を行い、*P* 値が 0.05 よりも小さい場合に統計学的に有意とした。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. チーズが健常マウスの免疫系に与える影響

C57BL/6J マウスにチーズ配合飼料及び対照飼料を 5 週間摂取させた後、脾細胞及びパイエル板細胞を分離し、CD3/CD28 共刺激下でのサイトカイン産生及び CD4<sup>+</sup>細胞中の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合を測定した。チーズ摂取群では、対照群と比較して、パイエル板における IL-17、IL-4 及び IL-10 の産生が有意に抑制されていた (Figure 1-1A-C)。パイエル板における INF- $\gamma$  の産生は、群間で有意な差がなかった (Figure 1-1D)。一方、脾臓ではサイトカイン産生に群間で有意な差はなく、チーズの摂取による影響は認められなかった (Figure 1-1A-D)。また、CD4<sup>+</sup>細胞中の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合は、チーズ摂取群のパイエル板で有意に高い値を示した。一方、脾臓では群間で有意な差がなく、サイトカイン産生と同様にチーズの摂取による影響は認められなかった (Figure 1-2)。

#### 1-3-2. チーズによる DSS 誘発大腸炎の緩和作用

C57BL/6J マウスにチーズ配合飼料及び対照飼料を 5 週間摂取させた後、DSS を 7 日間投与して大腸炎を誘発し、大腸炎に対するチーズの摂取による影響を検討した。対照群では DSS 投与開始 4 日後から体重が減少し始めたが、チーズ摂取群では体重の減少が有意に抑制された (Figure 1-3A)。体重減少、下痢及び血便から算出した DAI スコアは、対照群と比較してチーズ摂取群で有意に低い値を示し、大腸炎の臨床症状の緩和が確認された (Figure 1-3B)。また、大腸の全長は、対照群が無処置群と比較して有意に短かったが、チーズ摂取群

では対照群と比較して有意に長く、炎症による大腸の短縮が抑制されていた (Figure 1-3C, D)。

### 1-3-3. チーズが DSS 誘発大腸炎マウスの免疫系に与える影響

DSS 誘発大腸炎マウスの解剖時に、脾細胞及びパイエル板細胞を分離し、CD3/CD28 共刺激下での炎症性サイトカイン (IL-17、IL-6) 及び抗炎症性サイトカイン (TGF- $\beta$ 1、IL-10) の産生並びに CD4<sup>+</sup>細胞中の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合を測定した。IL-17 及び IL-6 の産生は、無処置群と比較して対照群のパイエル板で有意に促進されていたが、チーズ摂取群ではこれらの産生促進が有意に抑制されていた (Figure 1-4A, B)。対照群では脾臓においても IL-17 の産生が有意に促進されていたが、チーズ摂取群と対照群との間に有意な差は認められなかった (Figure 1-4A)。脾臓における IL-6 の産生は、パイエル板とは反対に、無処置群と比較して対照群で有意に抑制され、チーズ摂取群では対照群と比較して有意に促進されていた (Figure 1-4B)。一方、TGF- $\beta$ 1 の産生は、脾臓とパイエル板共に無処置群と対照群との間に有意な差はなかったが、対照群と比較してチーズ摂取群の脾臓及びパイエル板で有意に促進されていた (Figure 1-4C)。IL-10 の産生は、無処置群と比較して対照群のパイエル板で有意に促進されていたが、チーズ摂取群と対照群との間に有意な差は認められなかった。脾臓での IL-10 の産生は全ての群間で有意な差は認められなかった (Figure 1-4D)。また、CD4<sup>+</sup>細胞中の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合は、脾臓とパイエル板共に無処置群と比較して対照群で有意に高い値を示し、チーズ摂取群では対照群と比較して有意に低い値を示した (Figure 1-5)。

#### 1-4. 考察

LH2171 を使用して製造したチーズの摂取が、健常マウスの免疫系にどのような影響を与えるのかを検討した。検討では、全身免疫系組織の脾臓及び腸管免疫系組織のパイエル板を対象とし、それぞれの組織におけるサイトカイン産生と Treg 細胞（CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞）の割合を評価した。その結果、チーズの摂取は、健常マウスのパイエル板において、IL-17、IL-10 及び IL-4 の産生を抑制し、Treg 細胞の割合を増加させることが分かった。これらのチーズの摂取による免疫系への影響は、脾臓においては確認されなかった。そのため、チーズの摂取は、腸管組織特異的に免疫調節機能を発揮する可能性が示唆された。

Treg 細胞は、抗炎症性サイトカインである IL-10 及び TGF- $\beta$  を産生することで、他の Th 細胞サブセットの活性を抑制することが知られている [23]。本研究では、チーズの摂取により、パイエル板において Treg 細胞の割合が増加したにも関わらず、IL-10 産生は増加せずに抑制された。この原因には、パイエル板に含まれる T 細胞以外の細胞による影響が考えられる。IL-10 は、B 細胞、樹状細胞及びマクロファージなどの細胞からも産生される [76]。そのため、チーズの摂取が T 細胞以外の細胞からの IL-10 産生を抑制し、パイエル板全体での IL-10 産生が抑制された可能性が考えられる。また、パイエル板における Treg 細胞の割合が B 細胞の割合よりも少ないことから、チーズの摂取より Treg 細胞からの IL-10 産生が増加したとしても、パイエル板全体での IL-10 産生には反映されなかった可能性も考えられる。

チーズの摂取によるパイエル板での IL-17 産生の抑制には、Treg 細胞の増加が直接的に関与した可能性がある。炎症性サイトカインである IL-17 は、Th17

細胞と呼ばれる T 細胞サブセットから産生される [77, 78]。Treg 細胞と Th17 細胞は、拮抗する機能をもち、ナイーブ T 細胞からの分化過程においても互いの分化を抑制することが知られている [26, 27]。そのため、チーズの摂取によってパイエル板で増加した Treg 細胞が、Th17 細胞の活性を抑制したことで、IL-17 産生が抑制された可能性がある。

健常時において、Th17 細胞は、細胞外増殖性の細菌への感染防御応答に関与する。しかし、Th17 細胞の異常な活性化は、IBD などの自己免疫疾患の病態形成に関与することが知られている [28]。実際に、IBD 患者の末梢血リンパ球においては、Th17 細胞が増加し、Treg 細胞が減少していることが報告されている [79]。また、IBD の動物モデルである DSS 誘発大腸炎の病態形成においても、Th17 細胞が中心的な役割を果たすことが知られている [80]。チーズの摂取が、健常マウスのパイエル板において、Treg 細胞の割合を増加させ、IL-17 産生を抑制したことから、我々は、チーズの摂取が Th17 細胞の異常疾患である DSS 誘発大腸炎を緩和すると期待し、検証を行った。その結果、チーズの摂取により、大腸炎の臨床症状である、体重減少、下痢及び血便が緩和された。また、炎症に伴う大腸の短縮も、チーズの摂取により抑制された。これらの結果から、チーズの摂取が、マウスの DSS 誘発大腸炎の緩和に有効であることを確認した。

チーズの摂取による DSS 誘発大腸炎の緩和作用の機序を検討するため、脾臓及びパイエル板におけるサイトカイン産生と Treg 細胞の割合を評価した。パイエル板では、DSS 誘発大腸炎の発症により、炎症性サイトカインである IL-17 及び IL-6 の産生が増加し、チーズの摂取は、これらの炎症性サイトカイン



ンの産生の増加を抑制することが分かった。IL-6 は、IL-17 と同様に、DSS 誘発大腸炎の病態形成に関与することが報告されている [81]。そのため、チーズ摂取による IL-17 及び IL-6 の産生の抑制が、炎症の惹起を抑制し、DSS 誘発大腸炎の緩和に寄与した可能性がある。DSS 誘発大腸炎の発症は、脾臓及びパイエル板において、抗炎症性サイトカインである TGF- $\beta$  の産生には影響を与えなかった。これに対して、チーズの摂取は、脾臓及びパイエル板において TGF- $\beta$  の産生を増加させていることが分かった。TGF- $\beta$  は、細胞の分裂、分化、機能などを制御する多機能なサイトカインである [82, 83]。腸管における TGF- $\beta$  の機能としては、炎症により傷害を受けた腸管上皮細胞の再生に関与することが知られている [84]。また、TGF- $\beta$  欠失マウスでは DSS 誘発大腸炎が重篤化することが報告されている [85]。DSS 誘発大腸炎では、腸管のバリア機能が破壊され、腸管上皮細胞の増殖が抑制されてアポトーシスが誘導される。そのため、チーズ摂取による TGF- $\beta$  産生の増加が、腸管のバリア機能を補強し、DSS 誘発大腸炎の緩和に寄与した可能性がある。

本研究では、DSS 誘発大腸炎の発症により、脾臓及びパイエル板において Treg 細胞の割合が増加し、チーズの摂取は、これらの Treg 細胞の増加を抑制することが分かった。IBD 患者では、腸管組織の炎症部位で Treg 細胞が増加しており、Treg 細胞の細胞数と大腸炎の重症度には正の相関があることが報告されている [86]。また、IBD 患者の腸管組織から分離した Treg 細胞は、免疫抑制機能を保持していることが報告されている [87]。そのため、本研究で確認された脾臓及びパイエル板での Treg 細胞の増加は、大腸炎を抑制するための生体の防御応答の一部であると考えられる。チーズの摂取により脾臓及び

パイエル板で Treg 細胞の増加が抑制されたのは、先に述べたチーズの摂取による IL-17 及び IL-6 の産生の抑制や TGF- $\beta$  の産生の増加により大腸炎が抑制され、Treg 細胞の増加を伴う防御応答が起きなかったためだと考えられる。一方、IBD の動物モデルに Treg 細胞を移入すると大腸炎が緩和されることが報告されている [88-90]。チーズの摂取は、健常マウスのパイエル板において Treg 細胞を増加させた。そのため、DSS 誘発大腸炎の発症前にチーズの摂取によって予め増加した Treg 細胞が、DSS 誘発大腸炎の緩和に寄与した可能性も考えられる。しかし、チーズの摂取による DSS 誘発大腸炎の緩和に、Treg 細胞が関与したのか否かを明らかにするには、更なる検討が必要である。

DSS 誘発大腸炎を緩和したチーズ中の作用成分を同定するためには、更なる検討が必要である。チーズ中の作用成分の候補としては、乳酸菌及びその代謝産物であるアミノ酸、ペプチド及び脂肪酸などが考えられる。アミノ酸についてはグルタミンによる IBD 動物モデルの緩和作用が報告されている [91]。ペプチドについては、プロピオン酸菌の乳清タンパク質培養物による DSS 誘発大腸炎の緩和作用が報告されている [92]。脂肪酸については、共役リノール酸及び n-3 多価不飽和脂肪酸による DSS 誘発大腸炎の緩和作用が報告されている [93]。乳酸菌に関しては、近年、様々な菌株で IBD の緩和作用が報告されている。DSS 誘発大腸炎モデルにおいて大腸炎の緩和作用が確認されている乳酸菌には、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* がある [9-12]。これらの乳酸菌の多くが腸管上皮細胞のバリア機能を増強することで大腸炎を緩和すると考えられている。本研究で用いたチーズは、一般的なチーズ製造用の乳酸菌の他

に、LH2171 を追加使用して製造されている。先行研究において、LH2171 は、*in vitro* において Lipopolysaccharide (LPS) で刺激したマウスの脾細胞の増殖を抑制することが報告されている [94]。チーズの摂取による DSS 誘発大腸炎の緩和に LH2171 が関与したか否かは不明であるが、LH2171 による免疫細胞の増殖抑制作用が、DSS 誘発大腸炎の緩和に寄与した可能性が考えられる。

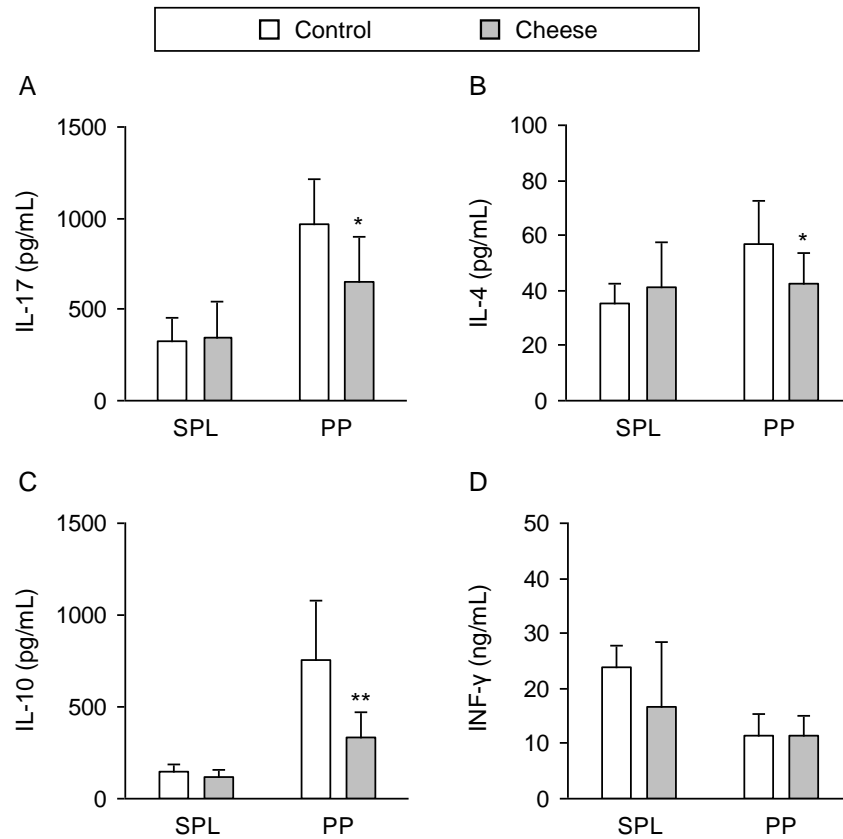
**Table 1.** Composition (%) of the experimental diets

Ingredients	Control diet	Cheese diet
Cheese powder <sup>1</sup>	-	43.9
Casein <sup>2</sup>	20.0	-
Cellulose	5.0	5.0
Corn oil	2.1	-
Lard	17.3	-
Sucrose	49.8	45.9
DL-methionine	0.3	0.3
Vitamin mix (AIN-76)	1.0	1.0
Mineral mix (AIN-76)	3.5	-
Mineral mix (for Cheese diet) <sup>3</sup>	-	3.5
NaCl	0.851	-
CaHPO <sub>4</sub>	0.187	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0.015
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	0.046
MgO	-	0.023
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	-	0.374

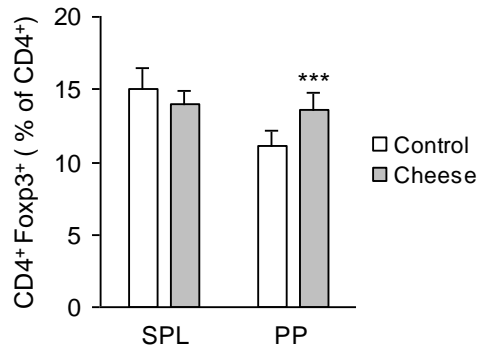
<sup>1</sup>Cheese powder = 45.6% protein, 44.2% fat, 5.9% ash, and 0.9% water.

<sup>2</sup>Casein = 87.5% protein, 0.9% fat, 1.8% ash, and 9.8% water.

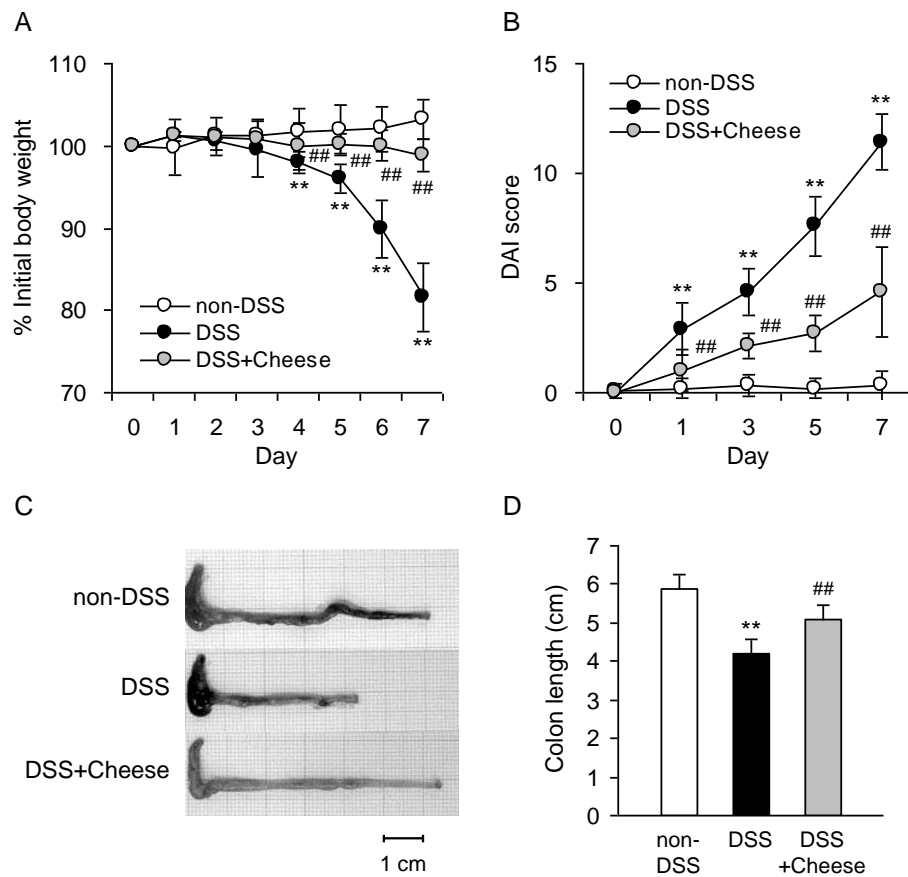
<sup>3</sup>Mineral mix (for Cheese diet) = 5.2% K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.35% MnCO<sub>3</sub>, 0.16% ZnCO<sub>3</sub>,  
0.055% CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•12H<sub>2</sub>O, 0.03% CuCO<sub>3</sub>•Cu(OH)<sub>2</sub>•H<sub>2</sub>O, 0.001% Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O,  
0.001% KIO<sub>3</sub> and 94.203% sucrose.



**Figure 1-1.** Effect of cheese diet on cytokine production in the spleen (SPL) and Peyer's patch (PP) cells of normal mice. Cells were isolated from mice fed the control diet (Control) or the cheese diet (Cheese), and stimulated with anti-CD3/CD28-conjugated beads. After 48 to 72 hours of stimulation, levels of (A) IL-17, (B) IL-4, (C) IL-10, and (D) INF- $\gamma$  in cell culture supernatants were measured by an ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=10) and compared with the control group (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ) by Student's  $t$ -test.

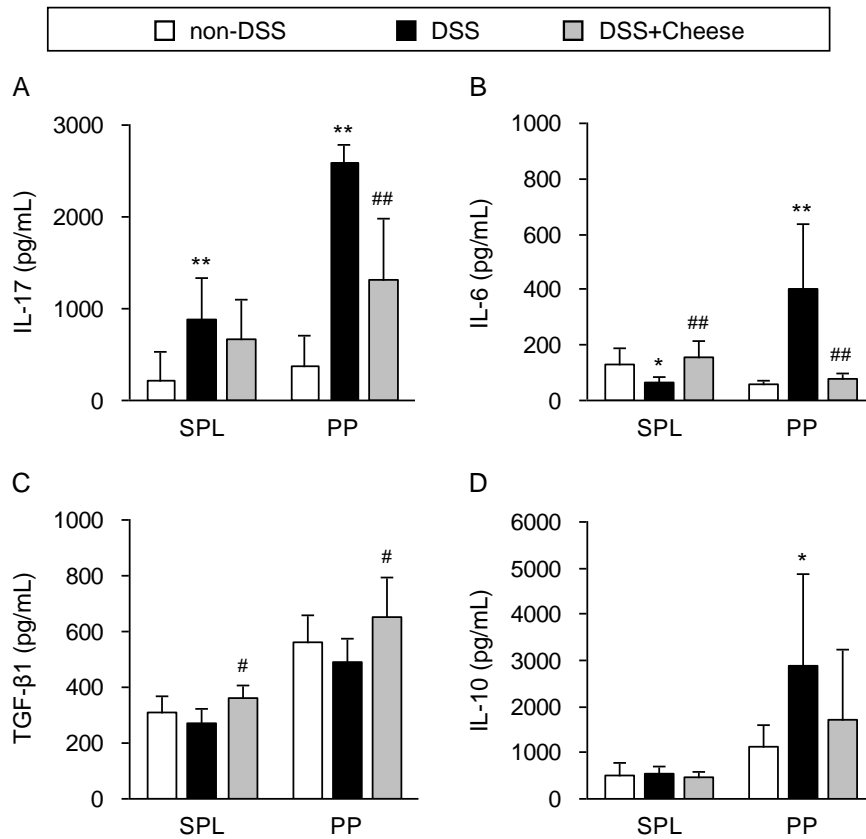


**Figure 1-2.** Effect of cheese diet on the population of Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells in the spleen (SPL) and Peyer's patch (PP) of normal mice. Cells were isolated from mice fed the control diet (Control) or the cheese diet (Cheese), and analyzed for CD4 and Foxp3 expression by flow cytometry. The bars represent the ratio of Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells to whole CD4<sup>+</sup> cells. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=10) and compared with the control group (\*\*\*  $P < 0.001$ ) by Student's *t*-test.



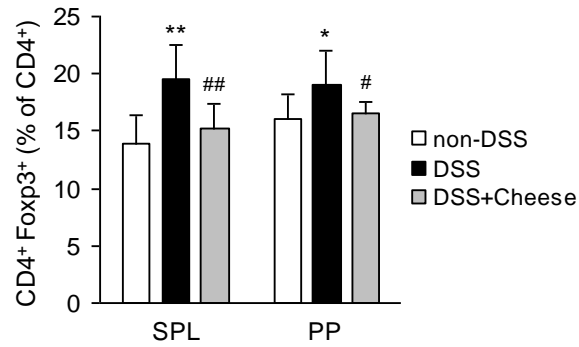
**Figure 1-3.** Effect of cheese diet on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis.

Mice were divided into 3 groups: DSS-untreated mice fed the control diet (non-DSS), DSS-treated mice fed the control diet (DSS), and DSS-treated mice fed the cheese diet (DSS + cheese). The DSS and DSS + cheese groups were treated with 2% (w/v) DSS for 7 days to induce colitis. (A) Body weight; (B) disease activity index (DAI); (C) macroscopic appearance of a representative colon; and (D) colon length. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=10) and compared with the non-DSS group (\*\*  $P < 0.01$ ) or with the DSS group (##  $P < 0.01$ ) by the Tukey-Kramer test.



**Figure 1-4.** Effect of cheese diet on cytokine production in the spleen (SPL) and Peyer's patch (PP) cells in mice with dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. Seven days after the administration of DSS, SPL and PP cells were isolated and stimulated with anti-CD3/CD28-conjugated beads. After 48 to 72 hours of stimulation, levels of (A) IL-17, (B) IL-6, (C) transforming growth factor (TGF)-β1, and (D) IL-10 in cell culture supernatants were measured by an ELISA. Data are expressed as mean ± SD (n=10) and compared with the non-DSS group (\*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ ) or with the DSS group (#  $P < 0.05$  and ##  $P < 0.01$ ) by the Tukey-Kramer test.





**Figure 1-5.** Effect of cheese diet on the population of Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells in the spleen (SPL) and Peyer's patch (PP) cells in mice with dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. Seven days after the administration of DSS, SPL and PP cells were isolated and analyzed for CD4 and Foxp3 expression by flow cytometry. The bars represent the ratio of Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells to whole CD4<sup>+</sup> cells. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=10) and compared with the non-DSS group (\*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ ) or with the DSS group (#  $P < 0.05$  and ##  $P < 0.01$ ) by the Tukey-Kramer test.

## 第 2 章 *Lactobacillus helveticus* SBT2171 によるリンパ球の増殖抑制作用及び その制御機構

### 2-1. 序論

第 1 章では、LH2171 を使用して製造したチーズの摂取が、健常マウスのパ  
リエル板において、IL-17、IL-10 及び IL-4 の産生を抑制し、Treg 細胞の割合  
を増加させることを明らかにした。これらの免疫系への影響は、全身免疫系組  
織である脾臓では確認されなかったため、LH2171 を使用して製造したチーズ  
の摂取は、腸管免疫系特異的に免疫調節機能を発揮する可能性が示唆された。  
LH2171 を使用して製造したチーズの摂取が、腸管免疫系において Treg 細胞の  
割合を増加させ、IL-17 産生を抑制したことから、我々は、LH2171 を使用し  
て製造したチーズの摂取が Th17 細胞の異常疾患であるマウスの DSS 誘発大腸  
炎を緩和すると期待して検証を行った。その結果、LH2171 を使用して製造し  
たチーズの摂取が、マウスの DSS 誘発大腸炎の症状を緩和することを明らか  
にした。DSS 誘発大腸炎の緩和に LH2171 が関与したか否かは不明である。し  
かし、先行研究において、LH2171 は、*in vitro* において LPS で刺激したマウス  
の脾細胞の増殖を抑制することが報告されている [94]。そのため、LH2171  
による免疫細胞の増殖抑制作用が、DSS 誘発大腸炎の緩和に寄与した可能性  
が考えられる。そこで、第 2 章では、LH2171 の菌体自体に免疫調節機能があ  
るのか否かを明らかにするため、自己免疫疾患や炎症などの過剰な免疫応答に  
みられるリンパ球の増殖に対して LH2171 の菌体がどのような影響を与える  
のかを *in vitro* で検証し、その制御機構についても検討した。また、ヒトの RA

の動物モデルである CIA マウスを用いて、LH2171 の免疫調節機能が、*in vivo* において自己免疫疾患の緩和に寄与するの可否かを検証した。

## 2-2. 実験材料及び方法

### 2-2-1. 乳酸菌

*Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*) SBT2171 (LH2171) は、雪印メグミルク (東京、日本) において単離された。*L. helveticus* 及び *Lactobacillus gasseri* (*L. gasseri*) の基準株である *L. helveticus* JCM1120<sup>T</sup> 及び *L. gasseri* JCM1131<sup>T</sup> は、理化学研究所バイオリソースセンター (茨城、日本) より分与された。乳酸菌は、Lactobacilli MRS broth (BD Bioscience, CA, USA) に接種し、37℃で 16 時間培養した。培養後、3,000×g で 10 分間遠心して菌体を回収し、超純水で 2 回洗浄した後に凍結乾燥した。凍結乾燥菌体を 1× PBS で 10 mg/mL に懸濁し、80℃で 30 分間加熱して殺菌した。

### 2-2-2. マウス

C57BL/6N マウス (雄) 及び DBA/1J マウス (雄) は、日本エスエルシー (静岡、日本) より購入し、ラボMR ストック飼料 (日本農産工業、神奈川、日本) と滅菌水を自由摂取させて馴化させた。全ての動物実験は、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程に則り実施した。

### 2-2-3. 試薬及び抗体

Pacific Blue 標識抗マウス CD3ε 抗体 (clone: 145-2C11)、PE-Cy7 標識抗マウ

ス CD19 抗体 (clone: 6D5)、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 annexin V、Propidium iodide (PI) 及び 7-amino-actinomycin D (7-AAD) は、Biolegend (CA, USA) より購入した。Alexa Fluor 488 標識抗マウス CD4 抗体 (clone: RM4-5) は、BD Bioscience より購入した。ウサギ抗リン酸化 JNK 抗体 (clone: 81E11)、ウサギ抗 JNK 抗体、ウサギ抗リン酸化 c-Jun 抗体 (clone: D47G9)、ウサギ抗 c-Jun 抗体 (clone: 60A8)、ウサギ抗 cdc2 抗体、ウサギ抗  $\beta$ -actin 抗体 (clone: 13E5) 及び Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体は、Cell signaling technology (MA, USA) より購入した。Lipopolysaccharide (LPS) は、Sigma-Aldrich (MO, USA) より購入した。RNase A は、Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) より購入した。免疫用ウシ II 型コラーゲン及び Complete Freund's Adjuvant は、Chondrex (WA, USA) より購入した。

#### 2-2-4. 細胞分離

C57BL/6N マウス (雄、7~10 週齢) をイソフルラン (インターベット、東京、日本) 麻酔下で屠殺して解剖し、脾臓を摘出した。脾臓を細胞培養培地 (1 $\times$  RPMI 1640、10% FBS、10 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、0.05 mM 2-メルカプトエタノール) 中ですり潰し、70- $\mu$ m セルストレイナー (BD Bioscience) を通して、脾細胞の分散液を得た。脾細胞の分散液中に含まれる赤血球は、RBC lysis buffer (Biolegend) を用いて除去した。脾細胞を Alexa Fluor 488 標識抗マウス CD4 抗体、PE-Cy7 標識抗マウス CD19 抗体及び Pacific Blue 標識抗マウス CD3 $\epsilon$  抗体で染色した後、FACS Aria II セルソーター (BD Bioscience) を用いて、T 細胞 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>

細胞) 及び B 細胞 (CD19<sup>+</sup>細胞) を分取した。トリパンプブルー色素排除法により、脾細胞、T 細胞及び B 細胞中の生細胞数を測定した。

#### 2-2-5. 細胞培養

マウスの脾細胞、T 細胞及び B 細胞は、細胞培養培地 (1× RPMI 1640、10% FBS、10 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、0.05 mM 2-メルカプトエタノール) で培養した。Jurkat 細胞、BJAB 細胞及び RAW264.7 細胞は、細胞培養培地 (1× RPMI 1640、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、0.05 mM 2-メルカプトエタノール) で培養した。Caco-2 細胞は、細胞培養培地 (1× Dulbecco's modified eagle medium、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、1% Nonessential amino acids) で培養した。全ての細胞は、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。

#### 2-2-6. 細胞増殖試験

マウスの脾細胞を 5×10<sup>4</sup> cells/well の密度で 96-well 細胞培養用プレート (BD Bioscience) に播いて LPS (10 µg/mL) で刺激し、各種乳酸菌体 (1, 10, 100 µg/mL) の存在下又は非存在下で 72 時間培養した。マウスの T 細胞及び B 細胞を 5×10<sup>4</sup> cells/well の密度で 96-well 細胞培養用プレート (BD Bioscience) に播いて LPS (10 µg/mL) で刺激し、LH2171 (100 µg/mL) の存在下又は非存在下で 96 時間培養した。Jurkat 細胞及び BJAB 細胞を 3×10<sup>3</sup> cells/well の密度で 96-well 細胞培養用プレート (BD Bioscience) に播き、各種乳酸菌体 (1, 10, 100 µg/mL)

の存在下又は非存在下で 72 時間培養した。RAW264.7 細胞及び Caco-2 細胞を  $1 \times 10^3$  cells/well の密度で 96-well 細胞培養用プレート (BD Bioscience) に播き、各種乳酸菌体 (1, 10, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) の存在下又は非存在下で 72 時間培養した。培養後、Cell Counting Kit-8 (同仁化学、熊本、日本) により細胞増殖を測定した。

#### 2-2-7. 細胞周期の解析

BJAB 細胞を  $5 \times 10^5$  cells/well の密度で 6-well 細胞培養用プレート (BD Bioscience) に播き、LH2171 (100  $\mu\text{g/mL}$ ) の存在下又は非存在下で 72 時間培養した。培養後、1,500 rpm で 5 分間遠心して細胞を回収し、トリパンブルー色素排除法により生細胞数を測定した。細胞を 1×PBS で洗浄した後、冷 70% エタノールに分散して 4°C で 30 分以上固定した。固定後の細胞を 1×PBS で 2 回洗浄した後、RNase A (100  $\mu\text{g/mL}$ ) を加えて 37°C で 30 分間反応した。反応後の細胞を 1×PBS で 1 回洗浄した後、PI (25  $\mu\text{g/mL}$ ) を加えて 4°C で 15 分間染色した。染色後の細胞を FACS Buffer で 2 回洗浄した後、FACSCanto II フローサイトメーター (BD Bioscience) 用いて解析した。得られたデータは FACSDiva ソフトウェア (BD Bioscience) により解析し、全細胞に占める G0/G1 期、S 期及び G2/M 期の細胞の割合を算出した。

#### 2-2-8. ウェスタンブロッティング

BJAB 細胞を  $2.5 \times 10^5$  cells/well の密度で 6-well 細胞培養用プレート (BD Bioscience) に播き、LH2171 (100  $\mu\text{g/mL}$ ) の存在下又は非存在下で 72 時間培

養した。マウスの脾細胞を  $2 \times 10^7$  cells/dish の密度で 100-mm 細胞培養用ディッシュ (BD Bioscience) に播いて LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) で刺激し、LH2171 (100  $\mu\text{g/mL}$ ) の存在下又は非存在下で 72 時間培養した。培養後、1,500 rpm で 5 分間遠心して細胞を回収した。細胞を 1 $\times$  PBS で洗浄した後、cComplete Mini protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) 及び PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) を添加した RIPA (Radio-Immunoprecipitation assay) バッファー (50 mM Tris-HCl, pH7.5、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% deoxycholate acid、0.1% SDS) を加え、ローターを用いて 4 $^{\circ}\text{C}$  で 60 分間穏やかに転倒混和して細胞を溶解した。細胞溶解液中のタンパク質濃度を、BCA protein assay (Thermo Scientific, IL, USA) を用いて測定した。12.5% アクリルアミドゲルにタンパク質量が等しくなるようにサンプルを添加して電気泳動した後、ブロッターによりタンパク質をゲルから PVDF メンブレン (Millipore, MA, USA) に転写した。メンブレンを 5% BSA, 1 $\times$  TBS-T に浸し、室温で 60 分間ブロッキングした。ブロッキング後のメンブレンを 1 $\times$  TBS-T で洗浄した後、1 次抗体を添加した 5% BSA, 1 $\times$  TBS-T に浸して、ローターを用いて 4 $^{\circ}\text{C}$  で O/N 反応させた。1 次抗体反応後のメンブレンを 1 $\times$  TBS-T で洗浄した後、HRP 標識 2 次抗体を添加した 5% BSA, 1 $\times$  TBS-T に浸して、ローターを用いて室温で 2 次間反応させた。2 次抗体反応後のメンブレンを 1 $\times$  TBS-T 洗浄した後、Immobilon western (Millipore) を用いてバンドを化学発光させ、LAS-1000 Mini イメージアナライザー (富士フイルム、東京、日本) によりバンドを検出した。バンドの定量化には、画像解析ソフトウェア ImageJ (National Institute of Health, MD, USA) を使用した。

## 2-2-9. 動物実験

DBA/1J マウス（雄、8 週齢）20 匹を、平均体重がほぼ等しくなるように 10 匹ずつ対照群と LH2171 投与群の 2 群に分けた。関節炎を誘発させるため、100  $\mu\text{g}$  の免疫用ウシ II 型コラーゲン（0.05M acetic acid に 2 mg/mL で溶解し、等量の Complete Freund's Adjuvant と混合してエマルジョン化したもの）をマウスの尾根部の左右 2 ヶ所に分けて皮内投与した。1 回目の投与から 21 日後に 2 回目の免疫を 1 回目と同様に行った。LH2171 投与群には、1 回目の免疫の翌日から週 3 回、2 回目の免疫の翌日からは毎日、1 mg の LH2171 を腹腔内に投与した。対照群には 1× PBS を腹腔内に投与した。2 回目の免疫から 3 週間飼育し、関節炎症状、後肢の厚さ及び体重を測定した。関節炎の重症度は、Kanayama らの方法に従って、スコアを算出して評価した [95]。すなわち、4 肢それぞれについて 0~4 の 5 段階でスコア化し、その合計スコアを算出した。スコアは、正常な場合に 0、指のみの発赤又は局所的なわずかな膨潤があるときに 1、2 指以上の紅斑と中程度の膨潤があるときに 2、肢に顕著な膨潤と紅斑があるときに 3、肢に最大の膨潤、紅斑、変形及び関節強直があるときに 4 とした。スコアは関節炎が最も重篤な場合で 16 となる。

## 2-2-10. 統計解析

測定データは平均値±標準誤差で示している。特に記載が無い限り、多群間では一元配置分散分析法と Tukey-Kramer 法による検定を行い、2 群間では t 検定を行った。検定には StatView ソフトウェア（SAS Institute, NC, USA）を用い、*P* 値が 0.05 よりも小さい場合に統計学的に有意とした。



## 2-3. 結果

### 2-3-1. LH2171 によるリンパ球の増殖抑制作用

LH2171 の免疫調節作用を *in vitro* で評価するため、マウスの脾細胞の増殖に与える LH2171 の影響を検討した。検討には、対照の乳酸菌として、*L. helveticus* の基準株である *L. helveticus* JCM1120<sup>T</sup> (LH1120T) 及び *Lactobacillus gasseri* (*L. gasseri*) の基準株である *L. gasseri* JCM1131<sup>T</sup> (LG1131T) を使用した。C57BL/6N マウスから分離した脾細胞を LPS で刺激し、各乳酸菌を添加してから 72 時間後に細胞の増殖を測定した。その結果、LH2171 は、濃度依存的に有意に脾細胞の増殖を抑制した (Figure 2-1A)。LH2171 による脾細胞の増殖抑制作用は、LH1120T と同程度であり、LG1131T よりも強かった (Figure 2-1A)。これらの結果から、脾細胞に対する強い増殖抑制作用は、*L. helveticus* 種乳酸菌に共通した作用であることが示唆された。

脾細胞には、T 細胞及び B 細胞などのリンパ球の他にも、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞が含まれている。LH2171 が、抗原提示細胞を介さずに、直接的にリンパ球の増殖を抑制するの可否かを明らかにするため、C57BL/6N マウスの脾細胞から分離した T 細胞 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞) 及び B 細胞 (CD19<sup>+</sup>細胞) を LPS で刺激し、LH2171 を添加してから 96 時間後に各細胞の増殖を測定した。その結果、LH2171 は、T 細胞及び B 細胞の増殖を有意に抑制した (Figure 2-1B)。続いて、LH2171 がヒトのリンパ球の増殖を抑制するの可否かを検討した。検討には、ヒトの T 細胞由来の株化細胞である Jurkat 細胞及び B 細胞由来の株化細胞である BJAB 細胞を使用した。Jurkat 細胞及び BJAB 細胞に LH2171 又は LG1131T を添加して培養し、72 時間後に各細胞の

増殖を測定した。その結果、LH2171 は、Jurkat 細胞及び BJAB 細胞の増殖を有意に抑制した。一方、LG1131T は、Jurkat 細胞及び BJAB 細胞の増殖に影響を与えなかった (Figure 2-2A, B)。これらの結果から、LH2171 は、抗原提示細胞を介さずに、直接的にリンパ球の増殖を抑制することが分かった。

### 2-3-2. LH2171 は BJAB 細胞の細胞周期の進行を抑制する

LH2171 が BJAB 細胞の増殖を強く抑制したため、我々は、BJAB 細胞を用いて LH2171 によるリンパ球の増殖抑制作用の機序を検討することにした。始めに、LH2171 が BJAB 細胞に対して細胞毒性を示すのか否かを明らかにするため、BJAB 細胞に LH2171 を添加して培養し、72 時間後に BJAB 細胞の生細胞数と生存率を測定した。その結果、LH2171 により BJAB 細胞の生細胞数が有意に減少した (Figure 2-3A)。一方、BJAB 細胞の生存率は、LH2171 によって変化しなかった (Figure 2-3B)。これらの結果から、LH2171 は、BJAB 細胞に対して細胞毒性を示さないことが分かった。次に、LH2171 が、BJAB 細胞の細胞周期の進行に影響を与えているのか否かを明らかにするため、BJAB 細胞に LH2171 を添加して培養し、72 時間後に PI 染色により G0/G1 期、S 期及び G2/M 期の細胞の割合を算出した。その結果、LH2171 は、BJAB 細胞において、G0/G1 期の細胞の割合を有意に減少させ、S 期及び G2/M 期の細胞の割合を有意に増加させた (Figure 2-3C)。これらの結果から、LH2171 は、BJAB 細胞の細胞周期の進行を抑制していることが分かった。

2-3-3. LH2171 は BJAB 細胞の JNK シグナルを抑制して CDC2 の発現を抑制する

BJAB 細胞を含むヒト及びマウスの B 細胞由来の株化細胞では、恒常的な JNK シグナルの活性化が増殖に必要であることが報告されている [96]。そこで我々は、LH2171 による BJAB 細胞の増殖抑制作用に、JNK シグナルが関与しているのか否かを検討した。BJAB 細胞に LH2171 を添加して培養し、72 時間後に JNK 及び c-Jun の発現及びリン酸化をウェスタンブロッティングにより測定した。その結果、LH2171 は、JNK の発現及びリン酸化を有意に抑制した (Figure 2-4A)。また、LH2171 は、c-Jun のリン酸化も有意に抑制した。一方、LH2171 は c-Jun の発現には影響を与えなかった (Figure 2-4B)。これらの結果から、LH2171 は、BJAB 細胞において、JNK シグナルを抑制していることが分かった。

G2/M 期の細胞周期の進行に必要な CDC2 は、JNK シグナルによって発現が制御されている [97, 98]。また、c-Jun の欠失は、CDC2 の発現を減少させ、G2/M 期の細胞を蓄積させることで細胞周期の進行を抑制することが報告されている [97]。LH2171 が、BJAB 細胞において、G2/M 期の細胞の割合を増加させたことから (Figure 2-3C)、次に我々は、LH2171 による BJAB 細胞の増殖抑制作用に、CDC2 が関与しているのか否かを検討した。BJAB 細胞に LH2171 を添加して培養し、72 時間後に CDC2 の発現を測定した。その結果、LH2171 は、CDC2 の発現を有意に抑制した (Figure 2-4C)。これらの結果から、LH2171 は、BJAB 細胞の JNK シグナルを抑制し、CDC2 の発現を抑制していることが分かった。

#### 2-3-4. LH2171 によるコラーゲン誘発関節炎の緩和作用

LH2171 の免疫調節作用を *in vivo* で評価するため、マウスの CIA に与える LH2171 の腹腔内投与の影響を検討した。その結果、関節炎の発症率は、LH2171 の投与により有意に低下した (Figure 2-5A)。また、後肢の厚さ及び関節炎のスコアも、LH2171 の投与により有意に低下した (Figure 2-5B, C)。さらに、関節炎の重症化に伴う体重減少も、LH2171 の投与により有意に抑制された (Figure 2-5D)。

#### 2-4. 考察

我々は、LH2171 が、LPS 刺激下のマウスの T 細胞及び B 細胞並びにヒトのリンパ球由来の Jurkat 細胞及び BJAB 細胞の増殖を抑制することを明らかにした。また、BJAB 細胞を用いた LH2171 による増殖抑制作用の機序解析では、LH2171 が JNK シグナルの抑制を介して CDC2 の発現を抑制し、細胞周期の進行を抑制していることを明らかにした。さらに、LH2171 の腹腔内投与が、マウスの CIA の緩和に有効であること明らかにした。

リンパ球の活性化及び増殖を担う細胞内シグナル伝達経路には、ERK、p38 及び JNK などの MAPK や NF- $\kappa$ B などのシグナル因子が関与する [33, 34]。T 細胞の増殖には、ERK 及び JNK シグナルが必要であることが報告されている [35, 36]。また、B 細胞の増殖には、ERK 及び p38 シグナルが必要であることが報告されている [37, 38]。B 細胞由来の株化細胞である BJAB 細胞では、JNK シグナルの恒常的な活性化が増殖に必要であり、JNK シグナルの阻害剤である SP600125 は、BJAB 細胞の増殖を強力に抑制することが報告されてい

る [96]。JNK は、MKK4 及び MKK7 によってリン酸化されて活性化し、転写因子である c-Jun をリン酸化して活性化させる [99, 100]。リン酸化された c-Jun は、他の AP-1 ファミリーと共にホモ 2 量体又はヘテロ 2 量体形成し、様々な標的遺伝子の転写を促進する [101]。本研究において、LH2171 は、BJAB 細胞の JNK 及び c-Jun のリン酸化を抑制した。また、LH2171 は、BJAB 細胞の JNK の発現も抑制した。これらの結果から、LH2171 は、BJAB 細胞の JNK の活性化を、リン酸化のレベルではなく、タンパク質発現のレベルで抑制した可能性が示唆された。

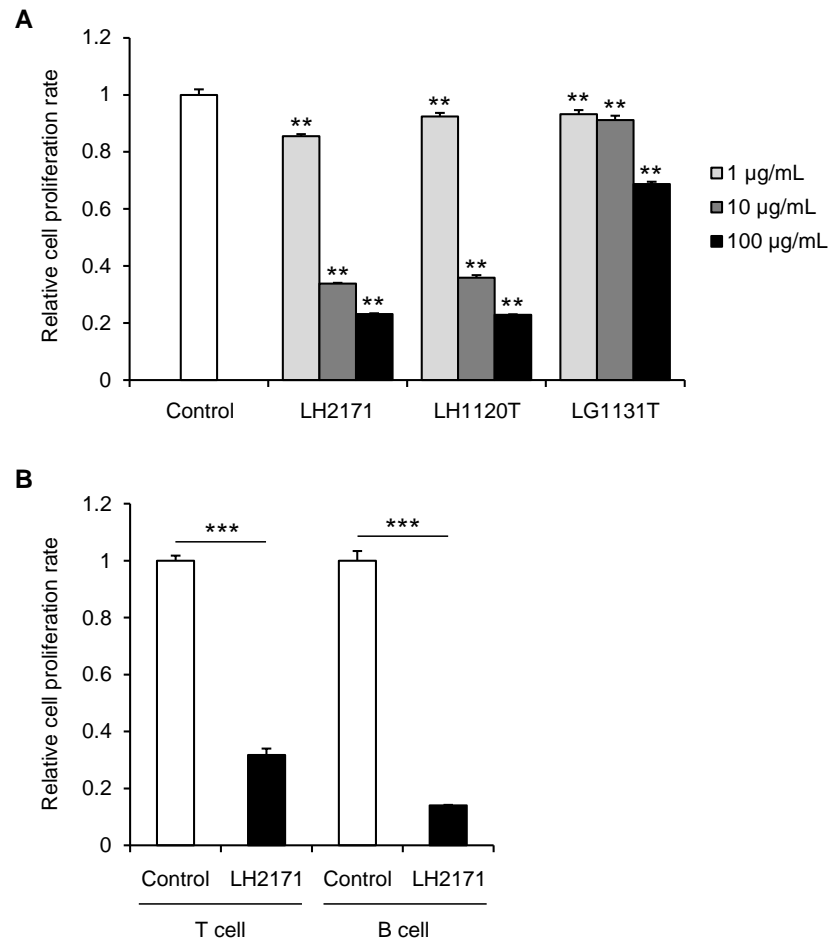
JNK シグナルは、サイクリン及びサイクリン依存性キナーゼ (CDKs) の発現や活性を制御することで、細胞周期を制御することが知られている。CDC2 は、G2 期から M 期への進行に必要な制御因子であり、その発現は JNK シグナルによる制御を受けている [97, 98]。また、c-Jun の欠失は、CDC2 の発現を減少させ、G2 期から M 期への細胞周期の進行を抑制することが報告されている [97]。本研究では、LH2171 が、BJAB 細胞において、G2/M 期の細胞の割合を増加させ、CDC2 の発現を強く抑制した。これらの結果から、LH2171 は、JNK シグナルの抑制を介して CDC2 の発現を抑制し、細胞周期の進行を抑制することで、細胞の増殖を抑制した可能性が示唆された。

LH2171 によるリンパ球の増殖抑制作用の作用因子を同定するためには、更なる検討が必要である。*L. gasseri* OLL2809 の菌体及びその RNA は、Myd88 シグナルを介してマウスの T 細胞の増殖を抑制することが報告されている [30]。細菌及びウイルスの RNA は、Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) 3 及び TLR7 によって細胞に認識される。BJAB 細胞は、TLR3 及び TLR7 を発現

していることが報告されているが [102]、我々の検討では、TLR3 リガンドである poly (I:C) 及び TLR7 リガンドである imiquimod を BJAB 細胞に作用させても増殖は抑制されなかった (data not shown)。この結果から、LH2171 による BJAB 細胞の増殖抑制作用に、TLR3 及び TLR7 のシグナルは関与しない可能性が示唆された。

我々は、マウスの CIA を、リンパ球の過剰な活性化及び増殖による炎症性疾患のモデルとし、LH2171 の免疫抑制作用の評価に用いた。その結果、LH2171 の腹腔内投与は、CIA の緩和に有効であることが分かった。T 細胞及び B 細胞は、CIA の病態形成において中心的な役割を果たすことが知られている [32, 102]。そのため、LH2171 によるリンパ球の増殖抑制作用が、CIA の緩和に寄与した可能性が考えられる。しかし、LH2171 による CIA の緩和作用の機序を解明するためには、更なる検討が必要である。

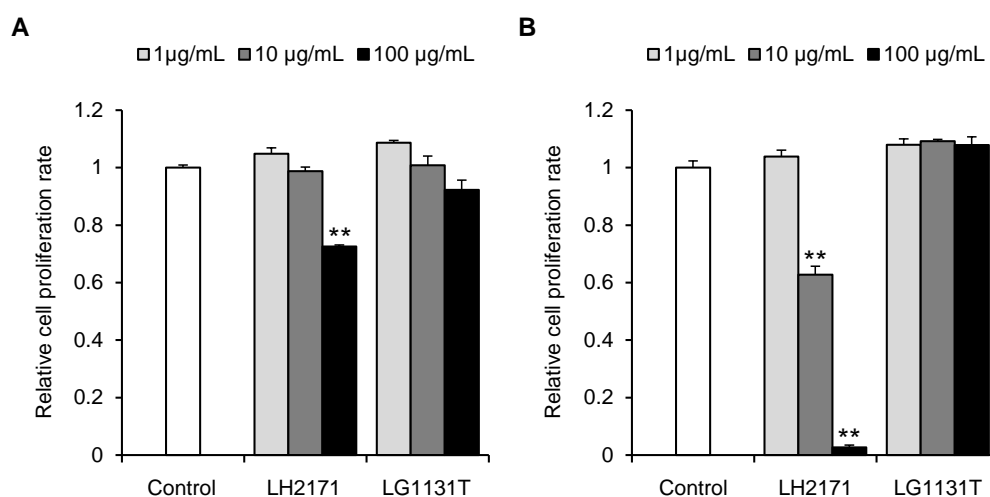
2 - 5 . 图表



**Figure 2-1. LH2171 suppressed the proliferation of mouse and human immune cells.** Splenocytes from C57BL/6N mice (A) were cultured with LPS (10 µg/mL) in the presence or absence of *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LH2171), *Lactobacillus helveticus* JCM1120<sup>T</sup> (LH1120T), and *Lactobacillus gasseri* JCM1131<sup>T</sup> (LG1131T) for 72 hours. CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells and CD19<sup>+</sup> B cell (B) isolated from splenocytes of C57BL/6N mice were cultured with LPS (10 µg/mL) in the presence or absence of LH2171 (100 µg/mL) for 96 hours. After cultivation, the

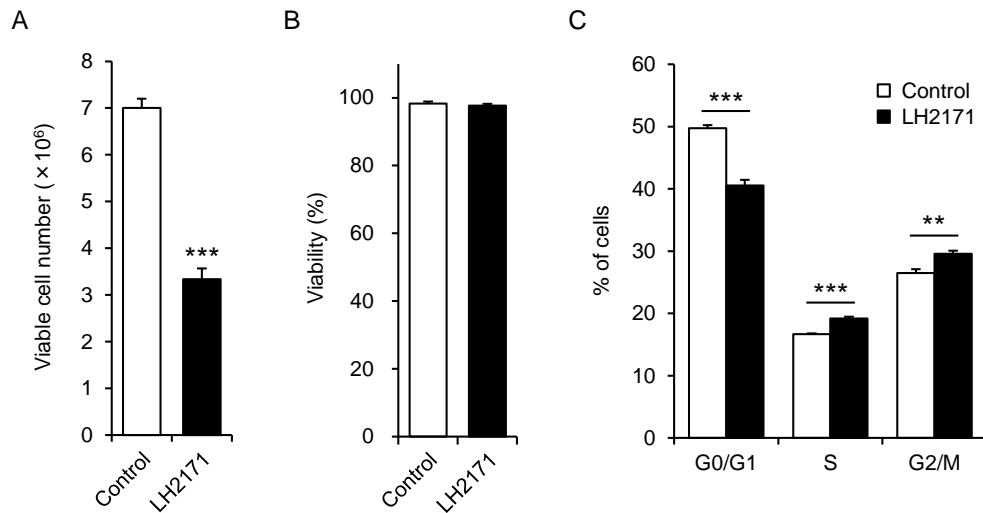
cell proliferation rate was measured using a Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan). Data are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) and compared with the control (\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ) by Tukey-Kramer's test (A) and Student's  $t$ -test (B).



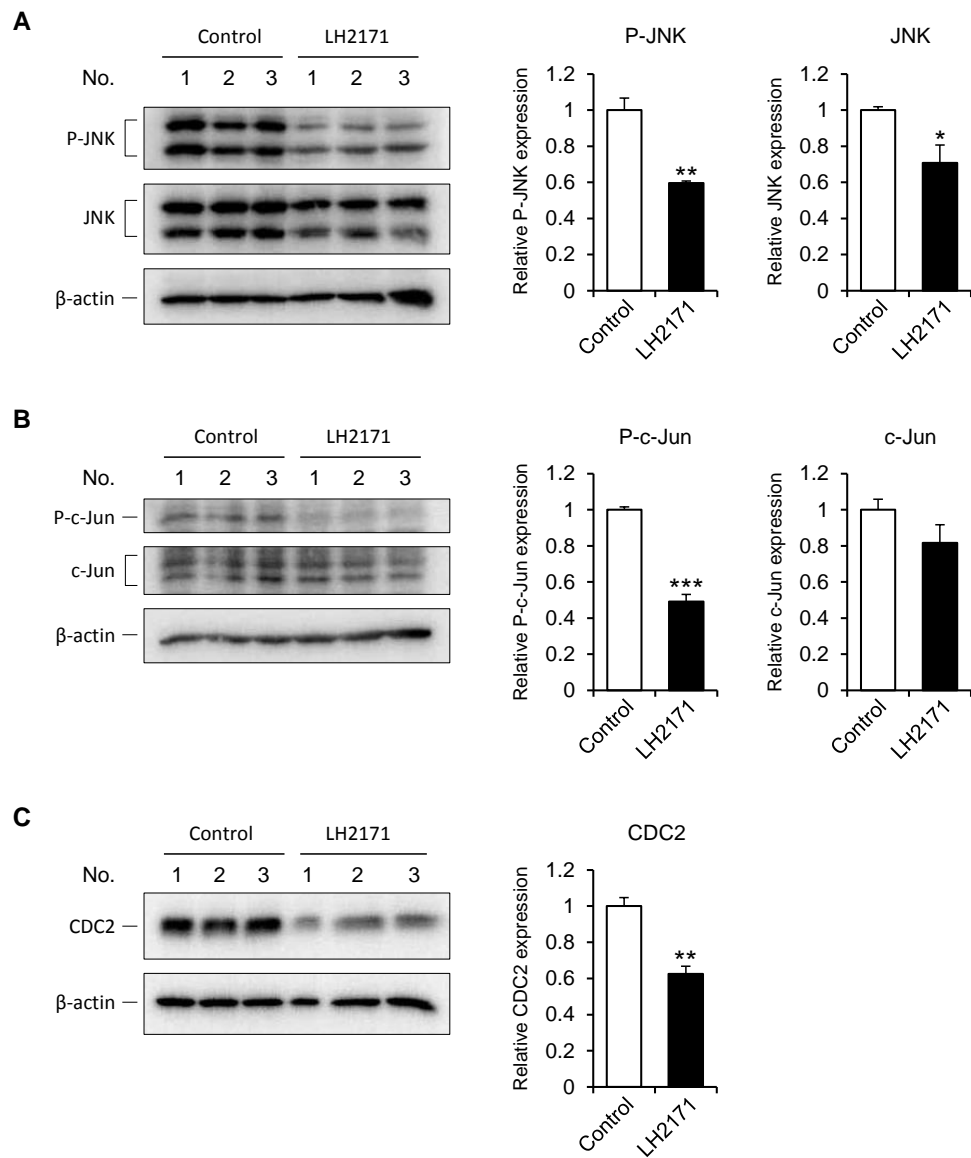


**Figure 2-2. LH2171 suppressed the proliferation of human lymphoma cell lines.**

Jurkat cells (A) and BJAB cells (B) were cultured in the presence or absence of *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LH2171) and *Lactobacillus gasseri* JCM1131<sup>T</sup> (LG1131T) for 72 hours. After cultivation, the cell proliferation rate was measured using a Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan). Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 3) and compared with the control (\*\*  $P < 0.01$ ) by Tukey-Kramer's test.

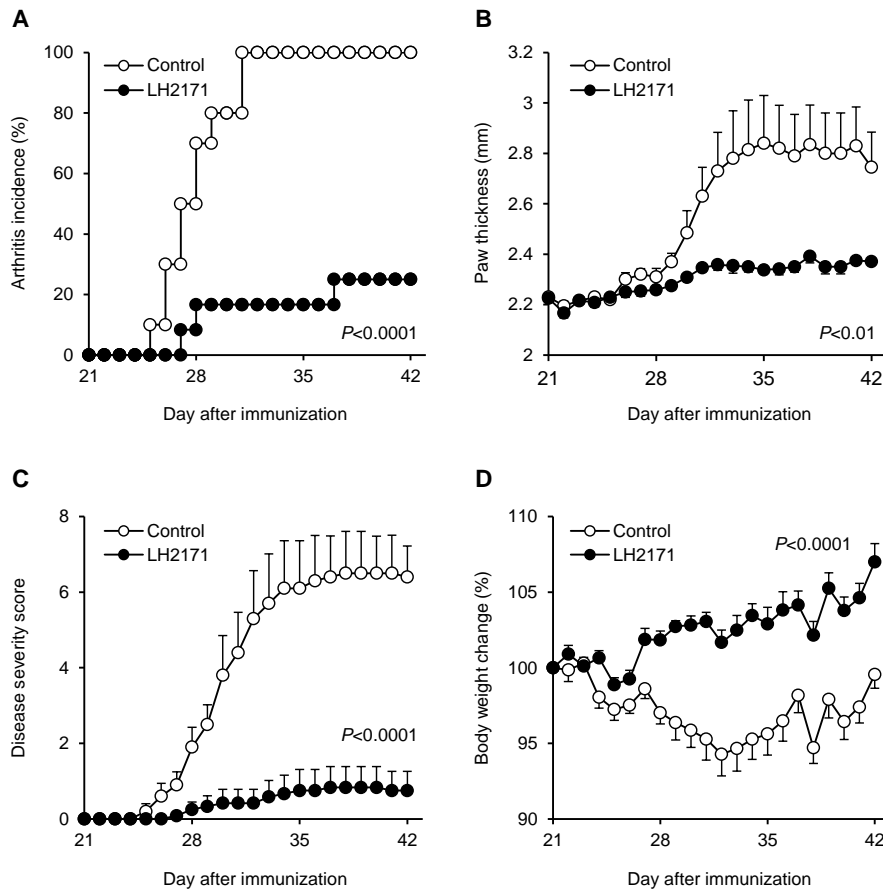


**Figure 2-3. LH2171 inhibited the cell cycle progression in BJAB cells.** BJAB cells were cultured in the presence or absence of *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LH2171) (100  $\mu\text{g/mL}$ ) for 72 hours. After cultivation, viable cell number (A) and viability (B) were calculated by trypan blue dye exclusion assay, and cell cycle (C) was analyzed by propidium iodide (PI) staining. Data are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) and compared with the control (\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ) by Student's  $t$ -test.



**Figure 2-4. LH2171 reduced CDC2 expression through the suppression of c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway in BJAB cells.** BJAB cells were cultured in the presence or absence of *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LH2171) (100 µg/mL) for 72 hours. The cell lysates were analyzed by western blotting to detect the expression of phosphorylated and total protein of JNK (A), c-Jun (B), and

CDC2 (C) in triplicate (indicated as 1-3 on the gels). Relative expression of each protein normalized by  $\beta$ -actin expression was quantitated. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 3) and compared with the control (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ) by Student's  $t$ -test.



**Figure 2-5. LH2171 alleviated collagen-induced arthritis (CIA) in mice.** To induce arthritis, DBA/1J mice (8-week-old) were immunized with an emulsion of 100  $\mu$ g of bovine type II collagen (CII) which was dissolved in 0.05 M acetic acid and emulsified in Complete Freund's Adjuvant (CFA), and with repeated immunization after 21 days. LH2171 group mice were administered with 1mg heat-killed *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LH2171) by the intraperitoneal injection three times a week after the first immunization and daily after the second immunization. The control group mice were administered PBS with the same

frequency. After the second immunization, mice were observed for measurement of arthritis incidence (A), disease severity score (B), paw thickness (C), and body weight change (D). Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n =10) and compared with the control group by log-rank test (A) and two-way repeated measures ANOVA (B, C, D).

### 第 3 章 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 による IgA 抗体産生誘導作用及びその 制御機構

#### 3-1. 序論

LG2055 は、ヒトの糞便から単離された乳酸菌であり、整腸作用をもつプロバイオティクスとしてヨーグルトに使用されている。これまでに、LG2055 の健康機能として、ヒトの血中コレステロール低下作用 [68]、ヒト及びラットの内臓脂肪蓄積抑制作用が報告されている [69-71]。一方、LG2055 の免疫調節機能としては、先行研究において、マウスに LG2055 を摂取させると、インフルエンザウイルス感染が抑制されることが報告されている [72]。また、母マウスに LG2055 を摂取させると、母乳中の IgA 抗体量が増加し、仔マウスのロタウイルス感染が抑制されることも報告されている [73]。これらの報告から、LG2055 の摂取は、腸管において IgA 抗体産生を誘導し、宿主の感染防御能を増強する可能性が考えられる。IgA 抗体は、体内で最も多量に産生される免疫グロブリンであり、そのほとんどが腸内で産生されている。腸内で産生される IgA 抗体は、病原性微生物の腸管上皮細胞への付着及び感染を阻止し、細菌由来毒素を中和する機能がある [49]。腸内での IgA 抗体産生には、腸内細菌叢が GALT を恒常的に刺激することが必要である [51-54]。GALT における IgA 抗体産生誘導では、パイエル板において、樹状細胞と T 細胞の作用により、IgM 陽性 B 細胞から IgA 陽性 B 細胞への IgA クラススイッチが誘導される。IgA 陽性 B 細胞は、循環血液中へと遊走した後に腸管の粘膜固有層への移動し、そこで IgA 産生形質細胞に分化して IgA 抗体を産生する。ある種の

乳酸菌は、腸管での IgA 抗体産生を促進することが報告されている [42-46]。

しかし、乳酸菌が、腸管での IgA 抗体産生を誘導する詳細な制御機構については不明である。そこで、本研究では、LG2055 が腸管での IgA 抗体産生を誘導するの可否かを、健常マウスを用いて *in vivo* で検証し、その制御機構を B 細胞及び樹状細胞の共培養系を用いて *in vitro* で検討した。

### 3-2. 実験材料及び方法

#### 3-2-1. 乳酸菌

*Lactobacillus gasseri* (*L. gasseri*) SBT2055 (LG2055) は、雪印メグミルク（東京、日本）において単離された [66]。LH2055 は、2 L の *Lactobacilli* MRS broth（BD Bioscience, CA, USA）に接種し、37℃で18時間培養した。培養後、5,000×g、4℃で10分間遠心して菌体を回収した。動物実験に使用するため、回収した菌体を超純水で2回洗浄した後、500 mL の 10% (w/v) 乳糖水溶液に分散して凍結乾燥した。凍結乾燥粉末は、 $1.2 \times 10^{11}$  cfu/g の LG2055 生菌体を含み、65% が乳糖であった。得られた LG2055-乳糖粉末は、動物実験に使用するまで -80℃ で保存した。細胞実験に使用するため、培養後に遠心により回収した LG2055 の菌体を、超純水で2回洗浄した後に凍結乾燥した。凍結乾燥菌体を 1× PBS で 10 mg/mL に懸濁し、80℃で30分間加熱して殺菌した。細胞実験では、対照の乳酸菌として、*L. gasseri* JCM1131<sup>T</sup> (LG1131T)、*Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LH2171) 及び *Lactobacillus acidophilus* SBT2062 (LA2062) を用いた。LH2171 はチーズの製造に使用されており [59-61]、LA2062 はプロバイオティクスとして過去にヨーグルトに応用されていた [104]。LG1131T、LH2171



及び LA2062 の菌体は、細胞実験に使用するための LG2055 の菌体と同じ方法で調製した。

### 3-2-2. マウス

BALB/c マウス（雄）は、日本チャールス・リバー（神奈川、日本）及び日本エスエルシー（静岡、日本）より購入した。雪印メグミルク株式会社ミルクサイエンス研究所の動物実験施設における全ての動物実験は、NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（National Research Council）に従って実施した。北海道大学遺伝子病制御研究所の動物実験施設における全ての動物実験は、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程に則り実施した。

### 3-2-3. 試薬及び抗体

DNase I 及び Collagenase D は、Roche Diagnostics（Mannheim, Germany）より購入した。Collagenase type I、SB505124 及び BAFF は、Sigma-Aldrich（MO, USA）より購入した。Granulocyte macrophage colony stimulating factor（GM-CSF）及び LE135 は、和光純薬工業（大阪、日本）より購入した。Lipopolysaccharide（LPS）、Pam3CSK4 及び FSL-1 は、InvivoGen（CA, USA）より購入した。TGF- $\beta$ 1 は、R&D Systems（MN, USA）より購入した。Allophycocyanin（APC）標識抗マウス CD11c 抗体（clone: N418）、Fluorescein isothiocyanate（FITC）標識抗マウス CD11c 抗体（clone: N418）、Phycoerythrin（PE）標識抗マウス MHC-II 抗体（I-A/I-E, clone: M5）、抗マウス CD16/CD32 抗体及び 7-amino-actinomycin D（7-AAD）は、Biolegend（CA, USA）より購入した。FITC 標識抗マウス IgA

抗体（clone: C10-3）及び PE 標識抗マウス CD19 抗体は、BD Bioscience より購入した。PE 標識抗マウス B220 抗体（clone: RA3-6B2）及び抗ヒト／マウス TLR2 抗体は、eBioscience（CA, USA）より購入した。

### 3-2-4. 動物実験

AIN-93 飼料を基本にして、LG2055 配合飼料と対照飼料を作製した。LG2055 配合飼料には LH2055-乳糖粉末を 1%配合した。対照飼料には乳糖を 0.65%配合し、LG2055 配合飼料と対照飼料で乳糖の含有量に差がないように調節した。BALB/c マウス（雄、6 週齢）20 匹を 1 週間飼育して順化させた後、平均体重がほぼ等しくなるように 10 匹ずつ対照群と LG2055 摂取群の 2 群に分けた。対照群には対照飼料を、LG2055 摂取群には LG2055 配合飼料を自由摂取させた。飼料は毎日新しいものに交換した。飼料は -20℃で保存し、LG2055 配合飼料中の LG2055 生菌体の実験終了まで常に  $1.0 \times 10^9$  cfu/g 以上であることを確認した。飲用水は両群共に脱イオン水を自由摂取させた。5 週間の摂取期間後、全てのマウスをイソフルラン（インターベット、東京、日本）麻酔下で屠殺して解剖し、小腸と大腸を摘出した。小腸の管腔を 10 mL の冷 1×PBS で洗浄した。洗浄後の小腸からパイエル板を分離し、FCM 解析に用いた。小腸の上部 5 cm を空腸とし、下部 5 cm を回腸として分離した。大腸は縦に切り開いて内容物を除去し、冷 1×PBS で洗浄した。空腸、回腸及び大腸の重量を測定し、cOmplete Mini protease inhibitor cocktail（Roche Diagnostics, Mannheim, Germany）を添加した 1×PBS, 50 mM Tris-HCl（pH 6.8）を 40 倍量加え、ULTRA-TURRAX T25（IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Germany）を用いて破碎した。組織破碎

液中の残渣は、10,000×g で 15 分間遠心して除去した。組織破碎液中のタンパク質濃度を、BCA protein assay (Thermo Scientific, IL, USA) を用いて測定した。

### 3 - 2 - 5 . 細胞分離

パイエル板を細胞培養培地 (1× RPMI 1640、10% FBS、10 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、0.05 mM 2-メルカプトエタノール) 中ですり潰し、70-µm セルストレイナー (BD Bioscience) を通して、パイエル板細胞の分散液を得た。パイエル板細胞は 1× PBS で 2 回洗浄した後、細胞培養培地に再分散させた。粘膜固有層細胞を分離するため、パイエル板を取り除いた小腸を 5~7 等分して洗浄液 (1× HBSS、5% FBS、5 mM EDTA) に入れ、ローターを用いて 150 rpm で攪拌しながら 37°C で 30 分間洗浄した。洗浄液を新しいものに交換してさらに 2 回洗浄した後、小腸組織を細かく切って小片にし、酵素液 (1× RPMI 1640、1 mg/mL collagenase type I、10 µU/mL DNase I) に入れ、スターラーで攪拌しながら 37°C で 60 分間反応させた。反応後、44% と 70% の Percoll (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 溶液を用いた密度勾配遠心 (1,500×g、20 分間) により、小腸の粘膜固有層細胞を回収した。粘膜固有層細胞は 1× PBS で 2 回洗浄した後、細胞培養培地に再分散させた。

### 3 - 2 - 6 . FCM 解析

小腸のパイエル板細胞及び粘膜固有層細胞を、抗マウス CD16/CD32 抗体で処理した後、FITC 標識抗マウス IgA 抗体及び PE 標識抗マウス B220 抗体で染

色した。染色後の細胞を FACSCanto II フローサイトメーター (BD Bioscience) 用いて解析した。7-AAD により死細胞をゲーティングアウトした。得られたデータは FACSDiva ソフトウェア (BD Bioscience) により解析した。

### 3-2-7. パイエル板細胞からの CD11c<sup>+</sup>細胞の除去及び脾細胞からの B 細胞の分離

BALB/c マウス (雄、6~10 週齢) をイソフルラン (インターベット) 麻酔下で屠殺して解剖し、小腸のパイエル板及び脾臓を摘出した。パイエル板を洗浄液 (1×PBS、2 mM EDTA) に入れ、ローターで攪拌しながら 37°C で 45 分間洗浄して、上皮細胞を除いた。洗浄後のパイエル板を酵素液 (1×RPMI 1640、2 mg/mL collagenase D、10 µg/mL DNase I) に入れ、スターラーで攪拌しながら 37°C で 30 分間反応させた。反応後のパイエル板をすり潰し、70-µm セルストレイナー (BD Bioscience) を通して、パイエル板細胞の分散液を得た。パイエル板細胞中から CD11c<sup>+</sup>細胞を除去するため、パイエル板細胞を抗マウス CD11c 抗体磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) で標識した後、LD カラム (Miltenyi Biotec) に通して、カラムを通過した CD11c<sup>-</sup>細胞を回収した。パイエル板細胞中から CD11c<sup>+</sup>細胞を分離するため、磁気ビーズで標識したパイエル板細胞を LS カラム (Miltenyi Biotec) に通して、カラムに吸着した細胞を回収した。CD11c<sup>+</sup>細胞の純度を上げるため、カラムから回収した細胞を APC 標識抗マウス CD11c 抗体及び PE 標識抗マウス CD19 抗体で染色した後、FACSAria II セルソーター (BD Bioscience) を用いて、CD11c<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>細胞を分取した (純度 95% 以上)。脾細胞中から B 細胞を分離するため、脾細胞を抗マウス IgM 抗体

磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) で標識した後、LS カラム (Miltenyi Biotec) に通して、カラムに吸着した IgM<sup>+</sup>細胞を回収した(純度 95%以上)。回収した IgM<sup>+</sup>細胞を B 細胞として使用した。

### 3-2-8. 骨髓由来樹状細胞 (BMDC) の調製

BALB/c マウス (雄、6~10 週齢) をイソフルラン (インターベット) 麻酔下で屠殺して解剖し、大腿骨及び脛骨を摘出した。細胞培養培地を入れたシリンジで大腿骨及び脛骨から骨髓を押し出し、ピペッティングで分散させて、骨髓細胞の分散液を得た。骨髓細胞を細胞培養培地に分散し、 $4.0 \times 10^6$  cells/dish の密度で 100-mm 細胞培養用ディッシュに播いて、GM-CSF (40 ng/mL) を添加して 8 日間培養した。培養後、1,500 rpm で 5 分間遠心して細胞を回収した。回収した細胞を抗マウス CD16/CD32 抗体で処理した後、FITC 標識抗マウス CD11c 抗体及び PE 標識抗マウス MHC-II 抗体で染色し、FACSAria II セルソーター (BD Bioscience) を用いて CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>細胞を分取した (純度 95%以上)。分取した CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>細胞を BMDC として使用した。

### 3-2-9. 細胞培養

BMDC ( $5.0 \times 10^5$ ) を 12-well 細胞培養用プレートに播き、LG2055 (20 µg/mL) 及び SB505124 (5 µM) の存在下又は非存在下で 48 時間培養した。培養後、遠心により BMDC を回収し、RNA を抽出してリアルタイム PCR により遺伝子発現を解析した。また、培養上清を回収し、サイトカイン測定まで -80℃ で保存した。B 細胞 ( $5.0 \times 10^5$ ) を 96-well 細胞培養用丸底プレート (BD Bioscience)

に播き、LG2055 (10  $\mu\text{g/mL}$ )、BAFF (500 ng/mL)、TGF- $\beta$ 1 (0.001~1 ng/mL) 及び LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) の存在下又は非存在下で 7 日間培養した。B 細胞 ( $5.0 \times 10^5$ ) を、パイエル板細胞から分離した CD11c<sup>+</sup>細胞 ( $0.5 \times 10^5$ ) 又は BMDC ( $1.0 \times 10^5$ ) と共に 96-well 細胞培養用丸底プレート (BD Bioscience) に播き、LG2055 (10  $\mu\text{g/mL}$ )、LE135 (500 nM)、SB505124 (5  $\mu\text{M}$ )、抗ヒト/マウス TLR2 抗体 (5  $\mu\text{g/mL}$ )、Pam3CSK4 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 及び FSL-1 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) の存在下又は非存在下で 7 日間培養した。細胞間の接触をなくすため、B 細胞 ( $2.0 \times 10^6$ ) 及び BMDC ( $1.0 \times 10^5$ ) を、トランスウェルを入れた 24-well 細胞培養用プレート (BD Bioscience) に播き、LG2055 (20  $\mu\text{g/mL}$ ) の存在下又は非存在下で 7 日間培養した。培養後、培養上清を回収し、IgA 抗体測定まで -80°C で保存した。

### 3-2-10. RNA 抽出とリアルタイム PCR

BMDC から TRIzol (Molecular Research Center, OH, USA) を用いてトータル RNA を抽出し、TaqMan Reverse Transcription Reagent Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。cDNA を鋳型として、Applied Biosystems の TaqMan Universal PCR Master Mix 及び TaqMan Gene Expression Assay (BAFF: assay ID Mm00446347\_m1、APRIL: assay ID Mm00840215\_g1、RALDH2: assay ID Mm00501306\_m1、 $\beta$ -actin: assay ID Mm00607939\_s1) を用いて、リアルタイム PCR を行った。反応には ABI PRISM 7000 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を使用し、95°C で 20 秒間加熱した後、95°C で 3 秒間、60°C で 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイ

クル反応を行った。各遺伝子の発現量は、 $\beta$ -actin 遺伝子の発現量で標準化した。

### 3-2-1 1. 抗体及びサイトカインの測定

組織破砕液及び培養上清中の IgA 抗体は、ELISA キット (Bethyl Laboratories, TX, USA) を用いて測定した。培養上清中の IL-5、IL-6、IL-10、TGF- $\beta$  (Biolegend) 及び BAFF (R&D Systems) は、ELISA キットを用いて測定した。

### 3-2-1 2. 統計解析

測定データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示している。特に記載が無い限り、多群間では一元配置分散分析法と Tukey-Kramer 法または Dunnett 法による検定を行い、2 群間では t 検定を行った。検定には StatView ソフトウェア (SAS Institute, NC, USA) を使い、*P* 値が 0.05 よりも小さい場合に統計学的に有意とした。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. LG2055 は小腸において IgA 抗体産生を誘導する

LG2055 の IgA 抗体産生誘導能を *in vitro* で評価するため、マウスのパイエル板細胞の IgA 抗体産生に与える LG2055 の影響を検討した。検討には、対照の乳酸菌として、LG1131T、LH2171 及び LA2062 を用いた。パイエル板細胞に各乳酸菌を添加して 7 日間培養した後、培養上清中の IgA 抗体量を測定した。その結果、LG2055 は、他の乳酸菌と比較して最も強く IgA 抗体産生を増加させた (Figure 3-1A)。また、LH2055 は、培養時間及び濃度依存的に IgA 抗体産生を増加させた (Figure 3-1B, C)。続いて、LG2055 の IgA 抗体産生誘導能を *in vivo* で評価するため、マウスの小腸での IgA 抗体産生に与える LG2055 の影響を検討した。マウスに LG2055 を添加した飼料を 5 週間摂取させた後、小腸組織中の IgA 抗体量及び腸管組織中の IgA 抗体陽性細胞の割合を測定した。その結果、LG2055 の摂取により、空腸及び回腸組織中の IgA 抗体量が有意に増加した (Figure 3-1D)。また、パイエル板中の IgA 陽性 B 細胞 (IgA<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>細胞) の割合及び小腸粘膜固有層中の IgA 産生形質細胞 (IgA<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>細胞) の割合も、LG2055 の摂取により有意に増加した (Figure 3-1E, F)。

#### 3-3-2. LG2055 による IgA 抗体産生誘導には樹状細胞が重要である

LG2055 による IgA 抗体産生誘導に樹状細胞が関与するの可否かを明らかにするため、パイエル板細胞から樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup>細胞) を除去した場合と除去しない場合とで、LG2055 による IgA 抗体産生誘導に差が生じるのかを検討



した。CD11c<sup>+</sup>細胞を除去したパイエル板細胞及び CD11c<sup>+</sup>細胞を除去していないパイエル板細胞に LG2055 を添加して 7 日間培養した後、培養上清中の IgA 抗体量を測定した。その結果、CD11c<sup>+</sup>細胞を除去していないパイエル板細胞と比較して、CD11c<sup>+</sup>細胞を除去したパイエル板細胞では、LG2055 の添加による IgA 抗体産生が有意に低下した (Figure 3-2A)。LG2055 による IgA 抗体産生誘導への樹状細胞の関与をさらに検証するため、マウスの脾臓から分離した B 細胞 (IgM<sup>+</sup>細胞) を単独で、もしくは、パイエル板から分離した樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup>細胞) 又は BMDC と共に培養し、LG2055 を添加してから 7 日間後に培養上清中の IgA 抗体量を測定した。その結果、LG2055 は、B 細胞を単独で培養した場合でも IgA 抗体産生を増加させたが、B 細胞をパイエル板由来の樹状細胞及び BMDC と共に培養した場合の方が、より強く IgA 抗体産生を増加させた (Figure 3-2B, C)。続いて、LG2055 による IgA 抗体産生誘導に、樹状細胞から産生される可溶性因子又は樹状細胞と B 細胞との細胞接着のどちらが関与するのかを検討した。B 細胞及び BMDC を、トランスウェルを入れたプレートで培養し、LG2055 を添加してから 7 日間後に培養上清中の IgA 抗体量を測定した。その結果、LG2055 による IgA 抗体産生は、トランスウェルを入れた場合と入れない場合とで差がなかった (Figure 3-2D)。この結果から、LG2055 による IgA 抗体産生誘導には樹状細胞から産生される可溶性因子が必要であることが分かった。

### 3-3-3. LG2055 による IgA 抗体産生誘導に関与する因子

LG2055 により樹状細胞から産生される可溶性因子を明らかにするため、

BMDC を LG2055 存在下で 48 時間培養した後に、IgA 抗体産生に關与する遺伝子の発現量及びサイトカイン産生量を測定した。その結果、LG2055 により、BAFF 及びレチノイン酸合成酵素である Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2) の発現量が有意に増加した。一方、LG2055 は APRIL の発現量に影響を与えなかった (Figure 3-3)。また、LG2055 により、TGF- $\beta$ 、IL-6 及び IL-10 の産生量が有意に増加した。一方、LG2055 は IL-5 の産生量に影響を与えなかった (Figure 3-3)。これらの結果から、LG2055 により、BMDC において、IgA 抗体産生に關与する複数の因子の産生が誘導されることが分かった。

LG2055 による IgA 抗体産生誘導への TGF- $\beta$  及び RALDH2 の關与をさらに検証するため、TGF- $\beta$  受容体の阻害剤である SB505124 及びレチノイン酸受容体の阻害剤である LE135 を用いた検討を行った。マウスの脾臓から分離した B 細胞及び BMDC を LG2055 存在下で共培養し、SB505124 又は LE135 を添加した場合の IgA 抗体産生に与える影響を評価した。その結果、SB505124 は、LG2055 による IgA 抗体産生の増加を有意に低下させた。一方、LE135 は、LG2055 による IgA 抗体産生の増加に影響を与えなかった (Figure 3-4A)。これらの結果から、LG2055 による IgA 抗体産生誘導には、TGF- $\beta$  シグナルが關与することが分かった。

TGF- $\beta$  及び BAFF は、B 細胞の IgA クラススイッチに必要であることが知られている。そこで、B 細胞を TGF- $\beta$  及び LG2055 存在下で培養した場合に、IgA 抗体産生が誘導されるのかを検討した。これまでに報告されているように[105, 106]、B 細胞を TGF- $\beta$  及び LPS 存在下で培養すると、IgA 抗体産生が誘導された。一方、B 細胞を TGF- $\beta$  及び LG2055 存在下で培養しても、IgA 抗体産生

は誘導されなかった (Figure 3-4B)。次に、B 細胞を BAFF 及び LG2055 存在下で培養した場合に、IgA 抗体産生が誘導されるのかを検討した。その結果、BAFF 及び LG2055 存在下で培養した B 細胞では、IgA 抗体産生が誘導された (Figure 3-4C)。一方、BAFF 及び LA2062 存在下で培養した B 細胞では、IgA 抗体産生が誘導されなかった (Figure 3-4D)。

#### 3-3-4. IgA 抗体産生誘導因子の産生には TGF- $\beta$ が必要である

LG2055 による IgA 抗体産生誘導において、BMDC での IgA 抗体産生誘導因子の産生に TGF- $\beta$  シグナルが関与するのか否かを検討した。BMDC を LG2055 存在下で培養し、SB505124 を添加した場合の IgA 抗体産生誘導因子の産生量に与える影響を評価した。その結果、SB505124 は、BAFF 及び TGF- $\beta$  の産生量を LG2055 非存在下の場合と同程度まで低下させ、IL-6 及び IL-10 の産生量を部分的に低下させた (Figure 3-5)。これらの結果から、BMDC での IgA 抗体産生誘導因子の産生に、TGF- $\beta$  シグナルが関与することが分かった。

#### 3-3-5. LG2055 は TLRs を介して IgA 抗体産生を誘導する

先行研究において、LG2055 は、TLR4 欠失マウスの脾細胞の IgA 抗体産生を誘導し、TLR2 欠失マウスの脾細胞では IgA 抗体産生を誘導しないことが報告されている [73]。そこで、LG2055 による IgA 抗体産生誘導に TLR2 が関与するのか否かを検証するため、TLR2 中和抗体を用いた検討を行った。マウスの脾臓から分離した B 細胞及び BMDC を LG2055 存在下で共培養し、TLR2 中和抗体を添加した場合の IgA 抗体産生に与える影響を評価した。その結果、

TLR2 中和抗体の添加は、B 細胞を単独で培養した場合及び BMDC と共培養した場合の LG2055 による IgA 抗体産生の増加を有意に低下させた (Figure 3-6A)。また、TLR1/2 のリガンドである Pam3CSK4 及び TLR2/6 のリガンドである FSL-1 を、B 細胞及び BMDC の共培養系に添加すると、IgA 抗体産生が有意に増加した (Figure 3-6B)。これらの結果から、LG2055 による IgA 抗体産生誘導には、TLR2 シグナルが関与することが分かった。

### 3-4. 考察

*L. gasseri* は、ヒトの小腸における *Lactobacillus* 属乳酸菌の優占種であり [107]、本研究で用いた LG2055 は、ヒトの糞便から単離された菌株である。先行研究において、母マウスに LG2055 を摂取させると、母乳中の IgA 抗体量が増加し、仔マウスのロタウイルス感染が抑制されることが報告されている [73]。本研究において、我々は、マウスに LG2055 を摂取させると、小腸において IgA 抗体産生が誘導されることを明らかにした。LG2055 の摂取による小腸での IgA 抗体産生の誘導は、病原性微生物の腸管上皮細胞への付着及び感染の阻止や、細菌由来毒素の中和に寄与すると考えられる。腸管での IgA 抗体産生を誘導する乳酸菌は多く報告されている。しかし、*in vitro* で IgA 抗体産生を誘導することが確認されている乳酸菌であっても、*in vivo* では IgA 抗体産生の誘導が確認されない場合が多い [54, 108, 109]。プロバイオティクスとして利用されている乳酸菌の免疫系への作用は、同じ種であっても菌株によって異なることが知られている [110]。本研究では、LG2055 が、*in vitro* 及び *in vivo* において IgA 抗体産生を誘導することを確認した。さらに、LG2055

による *in vitro* での IgA 抗体産生の誘導は、*L. gasseri* の基準株及び他の *Lactobacillus* 属乳酸菌よりも強いことが分かった (Figure 3-1A)。これらの結果から、LG2055 は、*Lactobacillus* 属乳酸菌の中でも、IgA 抗体産生誘導能が強い菌株である可能性が示唆された。最近の研究から、IgA 抗体産生は、腸内細菌叢の維持に重要な役割を果たしていることが分かっている [111-113]。LG2055 の摂取は、ヒトの糞便中の *Staphylococcus* 属細菌 (ブドウ球菌) の割合及び腸内の有害物質である p-クレゾールの濃度を低下させることが報告されている [66, 67]。そのため、LG2055 による IgA 抗体産生の誘導は、腸内細菌叢を健全な状態に維持することに役立つと考えられる。

腸管の樹状細胞は、TGF- $\beta$ 、IL-6、IL-10、APRIL、BAFF 及びレチノイン酸などの可溶性因子を産生し、IgA 抗体産生の誘導に重要な役割を果たすことが知られている [56-58]。プロバイオティクスとして利用されている乳酸菌は、樹状細胞と相互作用することで、樹状細胞のサイトカイン産生及び機能を調節することが報告されている [114, 115]。そこで、我々は、LG2055 による IgA 抗体産生誘導における樹状細胞の役割を検討した。B 細胞及びパイエル板由来樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup>細胞) 又は BMDC の共培養系による検討では、LG2055 による IgA 抗体産生誘導には樹状細胞が必要であることが分かった (Figure 3-2)。また、LG2055 との相互作用により、樹状細胞では、IgA 産生誘導に関与する BAFF、RALDH2、TGF- $\beta$ 、IL-6 及び IL-10 の遺伝子及びタンパク質の発現が増加することが分かった (Figure 3-3)。TGF- $\beta$  及び BAFF は、IgM 陽性 B 細胞から IgA 陽性 B 細胞への IgA クラススイッチを誘導し、IL-6 及び IL-10 は、IgA 陽性 B 細胞から IgA 産生形質細胞への分化を誘導することが知られている

[105]。LG2055 を摂取したマウスでは、パイエル板中の IgA 陽性 B 細胞 (IgA<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>細胞) の割合及び小腸粘膜固有層中の IgA 産生形質細胞 (IgA<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>細胞) の割合が増加した (Figure 3-1E, F)。これらの結果から、LG2055 は、樹状細胞と相互作用することで、IgA クラススイッチ及び IgA 産生形質細胞の分化を促進した可能性が示唆された。

最近の研究により、腸管の樹状細胞の産生するレチノイン酸は、IgA 抗体産生を促進することが明らかにされている [116]。また、B 細胞及び BMDC の共培養系においても、レチノイン酸の添加により BMDC からの TGF- $\beta$  の産生が促進され、B 細胞からの IgA 抗体産生が促進されることが報告されている [117]。腸管の樹状細胞が産生する主要なレチノイン酸合成酵素である RALDH2 (*ALDH1a2*) の遺伝子の発現が、LG2055 により BMDC において増加したにも関わらず、レチノイン酸受容体の阻害剤である LE135 は、LG2055 による IgA 抗体産生誘導を阻害しなかった (Figure 3-4A)。一方、TGF- $\beta$  受容体の阻害剤である SB505124 は、LG2055 による IgA 抗体産生誘導を阻害した (Figure 3-4A)。これらの結果から、B 細胞及び BMDC の共培養系における LG2055 による IgA 抗体産生誘導には、TGF- $\beta$  シグナルが必要であり、レチノイン酸受容体シグナルは関与していない可能性が示唆された。一方、腸管の樹状細胞の産生するレチノイン酸は、B 細胞に小腸へのホーミングに関与する因子を発現させることも知られている [116]。我々は、LG2055 を摂取させたマウスの小腸において RALDH2 の遺伝子発現が増加していることを確認している (data not shown)。そのため、LG2055 を摂取したマウスの小腸では、樹状細胞の産生するレチノイン酸を介した B 細胞の小腸へのホーミングの増加が、

IgA 抗体産生誘導に関与した可能性が考えられる。

BAFF 及びそのホモログである APRIL は、B 細胞の IgA クラススイッチを誘導することが知られている [118, 119]。また、B 細胞を TLR9 のリガンドであるオリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) で刺激すると、BAFF 及び APRIL の受容体である TACI の発現が増加し、IgA 抗体産生が誘導されることが報告されており [120]、BAFF 及び APRIL は、TLRs リガンドと協調して IgA 抗体産生を誘導することが知られている [121]。本研究では、B 細胞を LG2055 の存在下で培養した場合よりも、LG2055 及び BAFF の存在下で培養した場合の方が、IgA 抗体産生が増加することを確認した (Figure 3-4C)。さらに、B 細胞を単独で培養した場合及び BMDC と共培養した場合の LG2055 による IgA 抗体産生の増加が、TLR2 中和抗体の添加により低下することを確認した

(Figure 3-6A)。これらの結果から、LG2055 は、TLR2 シグナルを介して BAFF と協調し、B 細胞に IgA 抗体産生を誘導した可能性が示唆された。TLR2 は、乳酸菌などのグラム陽性菌の細胞壁に含まれるペプチドグリカンやリポテイコ酸を認識する。TLR2 シグナルを活性化する LG2055 の作用因子を特定するためには、更なる検討が必要である。本研究において、LG2055 と同じ

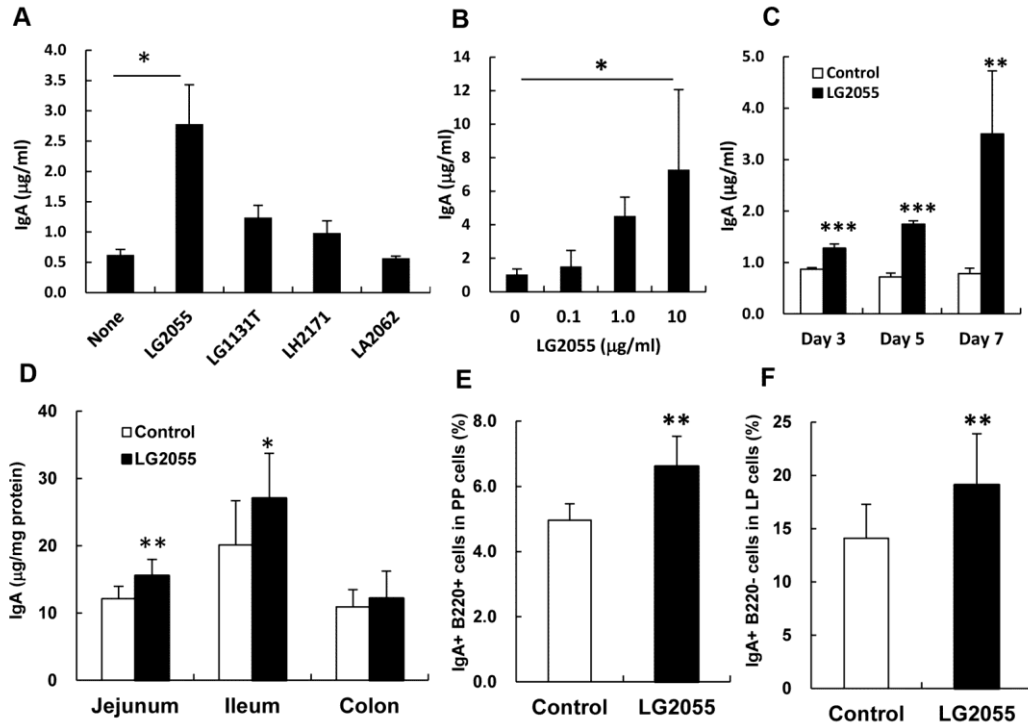
*Lactobacillus* 属乳酸菌である LA2062 を BAFF と共に B 細胞に作用させても、IgA 抗体産生は増加しなかった (Figure 3-4D)。同じ *Lactobacillus* 属乳酸菌であっても、細胞壁に含まれるペプチドグリカンやリポテイコ酸などの成分の量は、菌株によって大きく異なることが知られている [122]。そのため、LG2055 及び LA2062 による IgA 抗体産生誘導能の違いは、細胞壁に含まれる TLR2 リガンドの量の違いに起因している可能性が考えられる。

我々は、B 細胞及び BMDC の共培養系において、TGF- $\beta$  受容体の阻害剤である SB505124 が、LG2055 による IgA 抗体産生誘導を阻害することを確認し (Figure 3-4A)、LG2055 による IgA 抗体産生誘導に TGF- $\beta$  シグナルが必要であること明らかにした。また、B 細胞を LG2055 存在下で培養した場合に、TGF- $\beta$  を添加しても IgA 抗体産生が増加しなかったことから (Figure 3-4B)、LG2055 の IgA 抗体産生誘導における TGF- $\beta$  の標的細胞は、B 細胞ではなく BMDC である可能性が考えられた。さらに、BMDC を LG2055 存在下で培養すると、IgA 抗体産生誘導因子である BAFF、TGF- $\beta$ 、IL-6 及び IL-10 の産生量が増加するが、SB505124 を添加すると、これらの産生量の増加が抑制されることが分かった。これらの結果から、LG2055 存在下で培養した BMDC において、TGF- $\beta$  シグナルは、IL-6、IL-10 及び BAFF の発現に必要なだけでなく、TGF- $\beta$  自身の発現にも必要である可能性が示唆された。TGF- $\beta$  は、マウスのマクロファージにおいて BAFF の発現を誘導することが報告されており [123]、我々の検討でも、TGF- $\beta$  が、BMDC において BAFF の発現を誘導することを確認している (data not shown)。また、最近の研究から、樹状細胞の産生する TGF- $\beta$  が、オートクライン及びパラクライン効果により、樹状細胞自身の分化又は機能を制御することが分かっている。例えば、マウスの表皮に存在する未成熟な樹状細胞は、自身の産生する TGF- $\beta$  により成熟してランゲルハンス細胞に分化することが知られている [124, 125]。また、自己抗原に対する免疫寛容を誘導するマウスの CD8 陽性樹状細胞の機能維持には、自身の産生する TGF- $\beta$  による恒常的な刺激が必要であることが知られている [126]。IgA 抗体産生の誘導において、樹状細胞の産生する TGF- $\beta$  がオートクライン及びパラクライン効果



を有するの否かは不明である。しかし、少なくとも本研究の *in vitro* の検討においては、LG2055 の作用により BMDC から産生された TGF- $\beta$  が、オートクライン及びパラクライン効果によって、BMDC 自身からの IgA 抗体産生誘導因子の産生を誘導した可能性が示唆された。

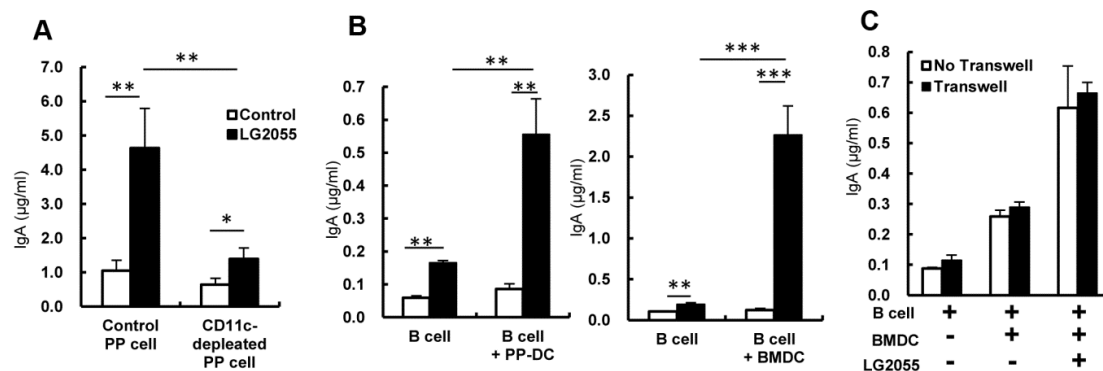
3 - 5 . 図表



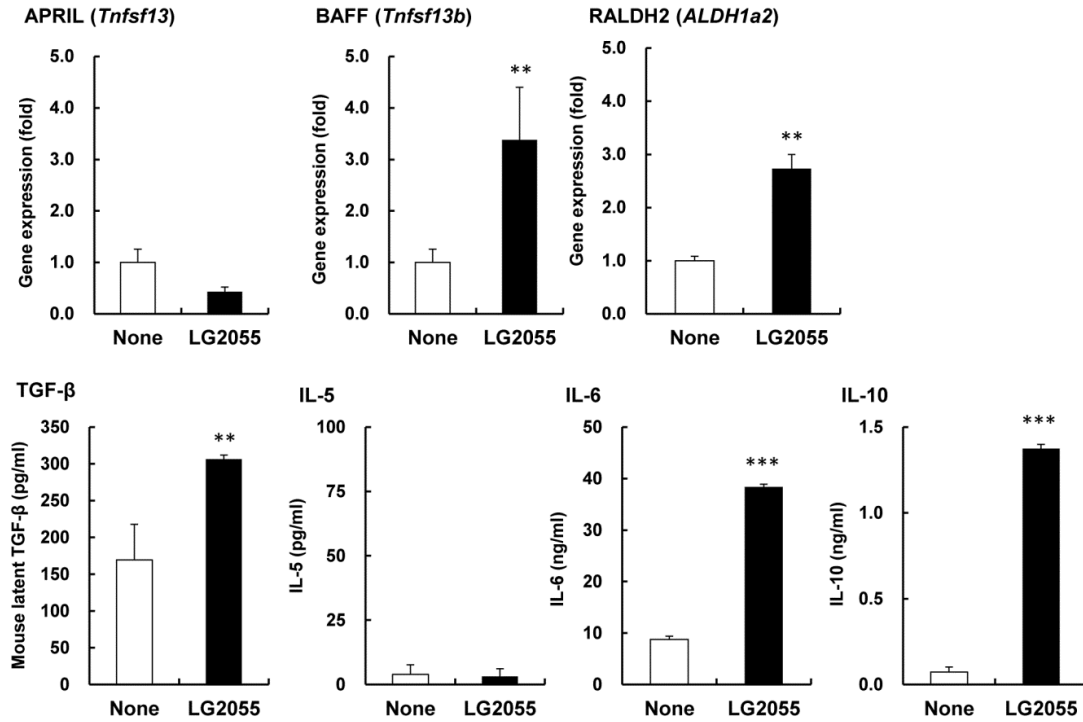
**Figure 3-1. Augmentation of IgA production by LG2055 *in vitro* and *in vivo*.**

Whole Peyer's patch (PP) cells were cultured with or without each of the four *Lactobacillus* strains (*Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055), *Lactobacillus gasseri* JCM1131<sup>t</sup> (LG1131T), *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LH2171), *Lactobacillus acidophilus* SBT2062 (LA2062), 10 μg/ml) for 7 days (A). Whole PP cells were cultured with 0, 0.1, 1.0, and 10 μg/ml of LG2055 for 7 days (B). Whole PP cells were cultured with or without LG2055 (10 μg/ml) for 3, 5, and 7 days (C). The amounts of IgA in culture supernatants were determined by ELISA. Each experiment was done with triplicate cultures; data are shown as the mean ± SD. The values for cells cultured with lactic acid bacteria are compared with that of without

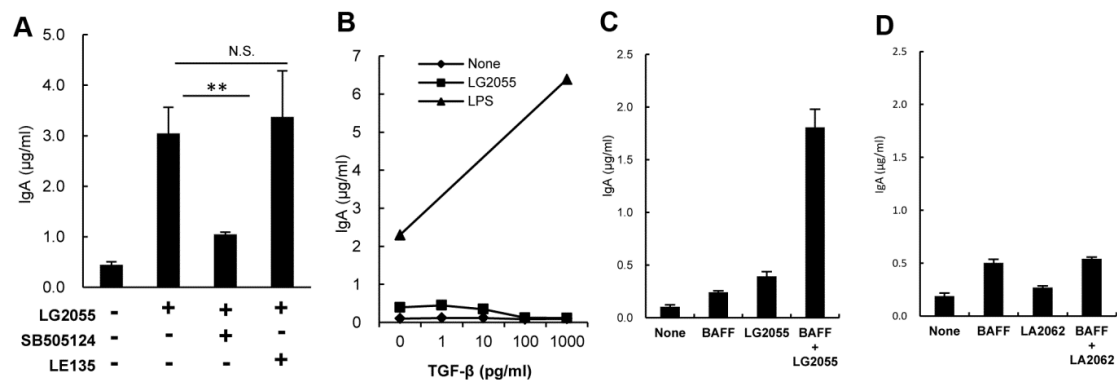
the bacteria by one-way ANOVA, Dunnett's post test (A and B) and the *t*-test (C). Significant differences are indicated by \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . LG2055 was orally administrated to BALB/c mice for 5 weeks. Amounts of total IgA in intestinal tissue extracts (D) were determined by ELISA. The population of IgA<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> cells in PP cells (E) and IgA<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> cells in LP cells (F) was analyzed by flow cytometry. Representative data from two independent experiments are shown. Data are shown as the mean  $\pm$  SD (number of mice  $n = 10$ ). Significant difference from control group at \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  was shown by the *t*-test (D, E, and F).



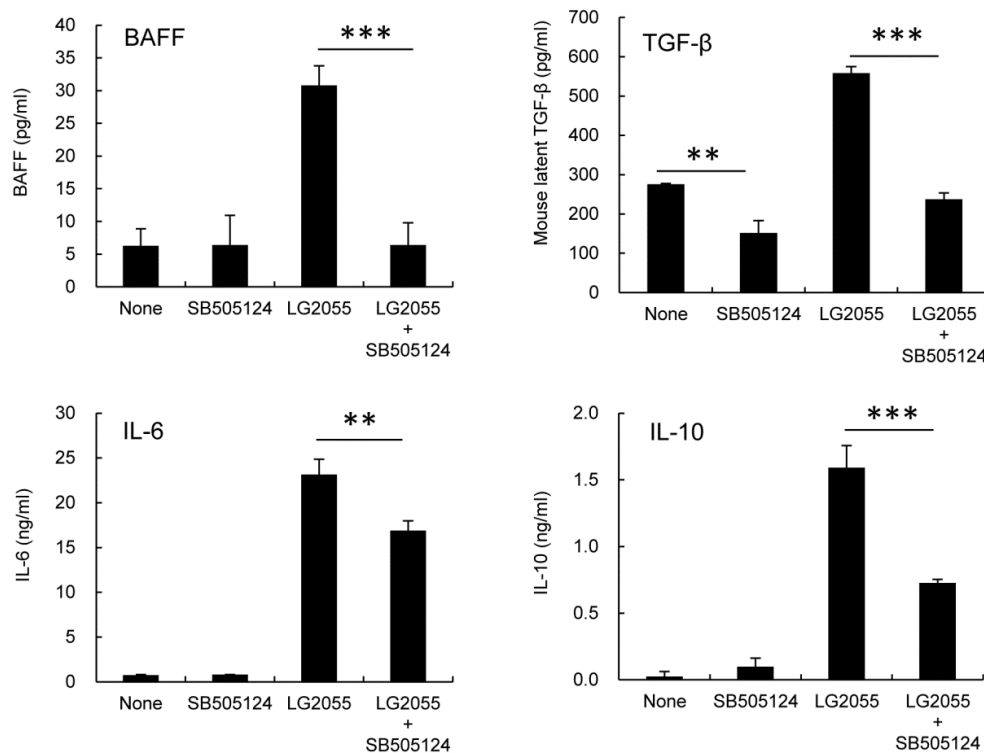
**Figure 3-2. Significance of dendritic cell for the induction of IgA production by LG2055.** (A) Whole Peyer's patch (PP) cells or CD11c<sup>+</sup> cell-depleted PP cells were cultured with or without heat treated *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055, 10 µg/ml) for 7 days. (B) B cells from the spleen were co-cultured with or without CD11c<sup>+</sup> cells derived from PP cells (left) or BMDC (right) in the presence or absence of the LG2055 for 7 days. (C) B cells were co-cultured with or without BMDC in the presence or absence of LG2055 in transwell system for 7 days. The amounts of IgA in culture supernatants were determined by ELISA. Representative data from three for PP cells or four for BMDC independent experiments are shown. Each experiment was done with triplicate cultures; data are shown as the mean ± SD. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  was shown by  $t$ -test.



**Figure 3-3. Gene expression and cytokine production of BMDC stimulated by LG2055.** BMDC was cultured with or without *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) for 48 hours. Gene expression of APRIL (*tnfsf13*), BAFF (*tnfsf13b*), RALDH2 (*aldh1a2*) in BMDC was determined by quantitative PCR. Amounts of TGF-β, IL-5, IL-6, and IL-10 in the culture supernatants were determined by ELISA. Representative data from three independent experiments are shown. Each experiment was done with triplicate cultures; data are shown as the mean  $\pm$  SD. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  was shown by *t*-test.

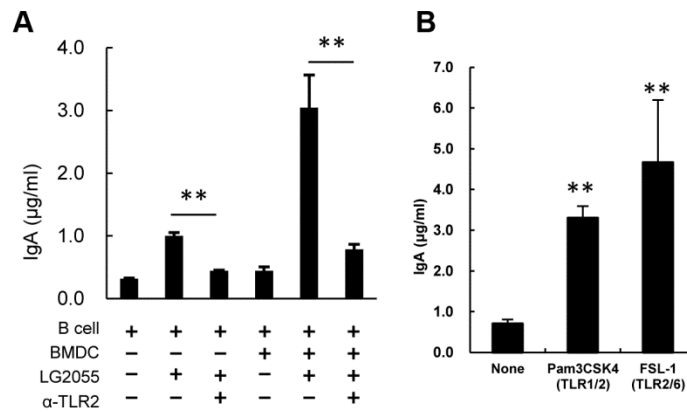


**Figure 3-4. Critical factors for induction of IgA production by LG2055.** (A) B cells and BMDC were co-cultured with or without *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) in the presence or absence of the TGF-β type I receptor inhibitor SB505124 or RAR antagonist LE135 for 7 days. (B) B cells were cultured with or without LG2055 or LPS (10 µg/ml) in the presence or absence of TGF-β for 7 days. B cells were cultured with or without LG2055 (C) or LA2062 (D), in the presence or absence of BAFF (500 ng/ml) for 7 days. IgA amounts in the supernatants were determined by ELISA. Representative data from three independent experiments are shown. Each experiment was done with triplicate cultures; data are shown as the mean ± SD. \*\*  $P < 0.01$ , was shown by  $t$ -test.



**Figure 3-5. Importance of TGF- $\beta$  type I signaling for the cytokine production**

**from BMDC by LG2055.** BMDC was cultured in the presence or absence of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) and TGF- $\beta$  type I receptor inhibitor SB505124 for 48 hours. Amounts of TGF- $\beta$ , IL-6, and IL-10 in the culture supernatants were determined by ELISA. Representative data from two independent experiments are shown. Each experiment was done with triplicate cultures; data are shown as the mean  $\pm$  SD. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  was shown by  $t$ -test.



**Figure 3-6. Significance of TLR2 in the induction of IgA production by LG2055.**

(A) B cells or both B cells and BMDC were cultured with or without *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) in the presence or absence of the anti TLR2 antibody for 7 days. (B) Pam3CSK4 (TLR1/2 ligand) or FSL-1 (TLR2/6 ligand) was added to the B cell and BMDC co-culture system, and cultured for 7 days. The amounts of IgA in culture supernatants were determined by ELISA. Representative data from three independent experiments are shown. Each experiment was done with triplicate cultures; data are shown as the mean  $\pm$  SD. \*\*  $P < 0.01$  was shown by  $t$ -test.



## 総括

腸内細菌叢は、腸管免疫系の発達や恒常性の維持に重要な役割を果たすことが明らかにされている。さらに、近年、次世代シーケンサーの活用によって腸内細菌叢の解析が進み、IBD や RA などの自己免疫疾患、肥満、糖尿病、大腸がんなどの疾患の発症に、腸内細菌叢の細菌種の構成の異常（dysbiosis）が関与していることが明らかになりつつある [127]。しかし、dysbiosis がなぜ疾患の発症につながるのかは、十分に明らかにされていない。乳酸菌は、腸内細菌叢を改善して整腸作用を発揮するだけでなく、宿主の獲得免疫系及び自然免疫系と相互作用することで、免疫調節作用を発揮することが明らかにされている [16]。そのため、免疫調節機能をもつ乳酸菌を使用した食品を日々の食生活に取り入れることは、免疫系疾患の発症の予防や QOL の改善につながると期待される。しかし、乳酸菌の免疫調節機能や免疫系疾患の緩和効果については、その多くが動物モデルでの報告であり、作用因子の同定とその制御機構を解明がこれからの課題である。そこで、本研究では、チーズやヨーグルトなどの乳製品に応用されている乳酸菌の免疫調節機能を明らかにし、さらにその詳細な制御機構を解明することを目的として研究を行った。

第 1 章では、LH2171 を使用して製造したチーズの摂取が免疫系にどのような影響を与えるのかを検証した。その結果、チーズの摂取は、健常マウスのパイエル板において、Treg 細胞を誘導し、IL-17、IL-4 及び IL-10 の産生を抑制することを明らかにした。腸管免疫系における Treg 細胞の誘導と IL-17 の産生抑制は、Th17 細胞の異常疾患である IBD の症状の緩和につながると期待された。そこで、LH2171 を使用して製造したチーズを DSS 誘発大腸炎マウスに

摂取させたところ、大腸炎の症状が緩和されることが明らかとなった。チーズを摂取したマウスでは、パイエル板において IL-17 及び IL-6 の産生が抑制されており、これらの炎症性サイトカインの産生抑制が、大腸炎の緩和に寄与した可能性が示された。また、チーズの摂取により、パイエル板において TGF- $\beta$  の産生が亢進しており、TGF- $\beta$  を介した腸管上皮細胞の修復機構が、大腸炎の緩和に関与した可能性も示された。さらに、チーズの摂取は、健常マウスのパイエル板では Treg 細胞を増加させたが、DSS 誘発大腸炎マウスのパイエル板では Treg 細胞を増加させなかった。このことから、DSS 誘発大腸炎発症前のチーズの摂取により腸管免疫組織で予め増加した Treg 細胞が、大腸炎を緩和した可能性が考えられる。しかし、チーズの摂取による DSS 誘発大腸炎の緩和に Treg 細胞がどのように関与したのかを明らかにするには、更なる検討が必要である。また、チーズ中の作用成分を同定することが今後の課題である。作用成分の候補としては、乳酸菌及びその代謝産物であるアミノ酸、ペプチド及び脂肪酸などが挙げられる。我々は、先行研究において、LH2171 が、*in vitro* において、LPS で刺激したマウスの脾細胞の増殖を抑制することを明らかにしている [94]。そのため、チーズに含まれる LH2171 が、腸管における免疫応答を抑制したことで、DSS 誘発大腸炎が緩和された可能性が考えられる。今後の検討では、LH2171 をマウスに経口投与し、DSS 誘発大腸炎が緩和されるか否かを検証する必要がある。

第 2 章では、LH2171 の菌体自体に免疫調節機能があるのか否かを検証した。我々は、LH2171 が、LPS で刺激した脾細胞の増殖を抑制することを明らかにしていた [94]。しかし、脾細胞には、T 細胞や B 細胞などのリンパ球の他に

も、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞が含まれており、LH2171 がどの細胞と相互作用して増殖を抑制しているのかは不明であった。そこで、マウスの脾細胞から T 細胞及び B 細胞を分取し、LH2171 による増殖抑制作用を検証した。その結果、LH2171 は抗原提示細胞を介さずに T 細胞及び B 細胞の増殖を直接的に抑制することを明らかにした。さらに、LH2171 は、ヒトのリンパ球由来の Jurkat 細胞及び BJAB 細胞の増殖を抑制し、特に BJAB 細胞に対しては強い増殖抑制作用を示すことを明らかにした。続いて、BJAB 細胞を用いて、LH2171 によるリンパ球の増殖抑制作用の制御機構を解析したところ、LH2171 により、JNK と c-Jun のリン酸化が抑制されており、JNK シグナルが抑制されていることを明らかにした。さらに、JNK シグナルにより発現が制御され、G2/M 期の細胞周期の進行に必要な CDC2 の発現が、LH2171 により抑制されていることも明らかにした。実際に、LH2171 を作用させた BJAB 細胞では、G2/M 期の細胞の蓄積が確認された。これらの結果から、LH2171 は、BJAB 細胞において、JNK シグナルの抑制を介して細胞周期の進行を抑制することで、細胞の増殖を抑制している可能性が示唆された。続いて、LH2171 によるリンパ球の増殖抑制作用が、免疫系疾患の予防及び緩和に効果があるのか否かを明らかにするため、CIA マウスを用いて検証を行った。その結果、LH2171 を腹腔内投与すると CIA の症状が緩和され、LH2171 による免疫調節作用が、*in vivo* においても発揮されることが明らかとなった。LH2171 によるリンパ球の増殖抑制作用が CIA の緩和に寄与したのか否かは不明であり、LH2171 による CIA の緩和作用の制御機構を解明することが今後の課題である。また、LH2171 を経口投与した場合にも、CIA が緩和されるのか否かを検証す

る必要がある。

第3章では、プロバイオティクスとしてヨーグルトに使用されている LG2055 の免疫調節機能として、腸管における IgA 抗体産生の誘導作用を検証した。先行研究において、母マウスに LG2055 を経口投与すると、母乳中の IgA 抗体量が増加し、仔マウスのロタウイルス感染が抑制されることが明らかにされている [73]。そのため、LG2055 は、腸管で IgA 抗体産生を誘導して宿主の感染防御能を増強する可能性が考えられた。本研究において、我々は、LG2055 の経口投与が、実際にマウスの腸管で IgA 抗体産生を誘導することを明らかにした。これにより、LG2055 には、IgA 抗体産生の誘導を介した感染防御能の増強作用が期待できることが分かった。我々は、先行研究において、LG2055 の経口投与が、マウスのインフルエンザウイルス感染を抑制することを報告している [72]。腸管免疫系を含む粘膜免疫系の特徴として、ある粘膜組織で誘導された IgA 抗体産生細胞が、粘膜免疫循環帰巢経路（common mucosal immune system; CMIS）と呼ばれる経路を介して、他の粘膜組織にもホーミングすることが知られている。そのため、LG2055 が腸管だけでなく気道の粘膜においても IgA 抗体の産生を誘導し、インフルエンザウイルス感染を抑制した可能性が考えられる。続いて、マウスの B 細胞及び BMDC を用いた共培養系を用いて、LG2055 による IgA 抗体産生の誘導作用の制御機構を検討した。検討の結果、LG2055 は、BMDC において BAFF、RALDH2、TGF- $\beta$ 、IL-6 及び IL-10 の発現を誘導することで、IgA 抗体産生を誘導することを明らかにした。LG2055 による IgA 抗体産生の誘導に関与するシグナルを特定するために、TGF- $\beta$  及びレチノイン酸受容体の阻害剤並びに TLR2 の中和抗体を用いて

検討を行ったところ、LG2055によるIgA抗体産生の誘導には、TGF- $\beta$ 及びTLR2のシグナルが関与し、レチノイン酸受容体のシグナルは関与していないことが明らかとなった。また、TGF- $\beta$ のシグナルは、BMDCにおいてBAFF、IL-6及びIL-10の発現を誘導するだけでなく、TGF- $\beta$ 自体の発現を誘導していることが分かった。このことから、少なくとも本研究で用いたB細胞及びBMDCを用いた共培養系においては、LG2055の作用によりBMDCから産生されたTGF- $\beta$ が、オートクライン及びパラクライン効果によって、BMDC自身からのIgA抗体産生誘導因子の産生を誘導した可能性が示唆された。LG2055によるIgA抗体産生誘導の作用因子を同定することが今後の課題である。本研究においては、TLR2シグナルがLG2055によるIgA抗体産生の誘導に関与していることを明らかにしている。TLR2は、グラム陽性菌の細胞壁に含まれるペプチドグリカンやリポテイコ酸を認識するため、LG2055の細胞壁成分に作用因子が含まれている可能性がある。細胞壁に含まれるペプチドグリカンやリポテイコ酸などの成分の量は、乳酸菌の菌株によって大きく異なることが知られている[122]。そのため、LG2055に確認された強いIgA抗体産生誘導作用は、細胞壁に含まれるTLR2リガンドの量に起因している可能性が考えられる。

以上のように、本研究において、チーズの製造に使用されているLH2171は、Treg細胞の誘導作用及びリンパ球の増殖抑制作用を有し、IBDやRAなどの自己免疫疾患を予防及び緩和する可能性があることを明らかにした。また、プロバイオティクスとしてヨーグルトに使用されているLG2055は、IgA抗体産生誘導作用を有し、ウイルスや細菌に対する感染防御能を増強する可能性があることを明らかにした。これらの免疫調節機能を有する乳酸菌を単独又は組み合

わせて食品に応用することで、免疫調節機能を有する機能性食品を開発できる可能性がある。これらの機能性食品を日々の食生活に取り入れることは、免疫系疾患の発症の予防や QOL の改善につながると期待される。

## 謝辞

本学位論文の執筆に当たり、終始ご懇切なるご指導とご校閲を賜りました明治大学大学院農学研究科生命科学専攻教授 加藤幸雄先生に深甚なる感謝の意を表します。本学位論文の審査に当たり、貴重なご助言とご指導を賜りました明治大学大学院農学研究科生命科学専攻教授 渡辺寛人先生並びに明治大学大学院農学研究科農芸化学専攻教授 竹中麻子先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究を進めるに当たり、適切なご指導とご助言を頂きました北海道大学大学院遺伝子病制御研究所特任教授 宮崎忠昭先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行に当たり、格別のご配慮を頂きました雪印メグミルク株式会社研究開発部長 小西寛明取締役、同ミルクサイエンス研究所長 吉岡俊満博士、同ミルクサイエンス研究所主幹 川崎功博博士、同ミルクサイエンス研究所酒井史彦博士、並びに同ミルクサイエンス研究所主席研究員 門岡幸男氏に心よりお礼申し上げます。

本研究を進めるに当たり、適切なご指導とご助言を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所特任助教 中山洋佑先生、北海道大学遺伝子病制御研究所特任助教 中川久子先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の実験を進める当たり、多くのご協力を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所 塩崎拓也博士、雪印メグミルク株式会社ミルクサイエンス研究所、上西寛司氏、大町愛子氏、小川哲弘氏、浮辺健博士、山下舞亜氏、並びに守屋智博氏に深く感謝いたします。

最後に、本研究の遂行並びに本学位論文の執筆に当たり、理解を示し、心身ともに支えとなってくれた家族に心から感謝いたします。

平成 24 年 12 月

細谷 知広

## 参考文献

1. FAO/WHO (2002) Guidelines for evaluation of probiotics in food.
2. Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A (2007) Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr* 137: 781S-790S.
3. Matsuzaki T, Takagi A, Ikemura H, Matsuguchi T, Yokokura T (2007) Intestinal microflora: probiotics and autoimmunity. *J Nutr* 137: 798S-802S.
4. Ouwehand AC (2007) Antiallergic effects of probiotics. *J Nutr* 137: 794S-797S.
5. Dongarrà ML, Rizzello V, Muccio L, Fries W, Cascio A, et al. (2013) Mucosal immunology and probiotics. *Curr Allergy Asthma Rep* 13: 19-26.
6. Goh K, Xiao SD (2009) Inflammatory bowel disease: a survey of the epidemiology in Asia. *J Dig Dis* 10: 1-6.
7. Asakura H, Suzuki K, Kitahara T, Morizane T (2008) Is there a link between food and intestinal microbes and the occurrence of Crohn's disease and ulcerative colitis? *J Gastroenterol Hepatol* 23: 1794-1801.
8. Kaur N, Chen CC, Luther J, Kao JY (2011) Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 2: 211-216.
9. Schreiber O, Petersson J, Phillipson M, Perry M, Roos S, et al. (2009) *Lactobacillus reuteri* prevents colitis by reducing P-selectin-associated leukocyte- and platelet-endothelial cell interactions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G534-G542.



10. Herías MV, Koninkx JF, Vos JG, Huis in't Veld JH, van Dijk JE (2005) Probiotic effects of *Lactobacillus casei* on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Int J Food Microbiol.* 103: 143-155.
11. Miyauchi E, Morita H, Tanabe S (2009) *Lactobacillus rhamnosus* alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase in vivo. *J Dairy Sci* 92: 2400-2408.
12. Nishitani Y, Tanoue T, Yamada K, Ishida T, Yoshida M, et al. (2009) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Int Immunopharmacol.* 9: 1444-1451.
13. Amdekar S, Singh V, Singh R, Sharma P, Keshav P, et al (2011) *Lactobacillus casei* reduces the inflammatory joint damage associated with collagen-induced arthritis (CIA) by reducing the pro-inflammatory cytokines: *Lactobacillus casei*: COX-2 inhibitor. *J Clin Immunol* 31: 147-154
14. Amdekar S, Singh V, Kumar A, Sharma P, Singh R (2013) *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* regulate inflammatory pathway and improve antioxidant status in collagen-induced arthritic rats. *J Interferon Cytokine Res* 33: 1-8.
15. Prisciandaro L, Geier M, Butler R, Cummins A, Howarth G (2009) Probiotics and their derivatives as treatments for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 15: 1906-1914.
16. van Baarlen P, Wells JM, Kleerebezem M (2013) Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends Immunol* 34: 208-215.

17. Shida K, Takahashi R, Iwadate E, Takamizawa K, Yasui H, et al. (2002) Lactobacillus casei strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. Clin Exp Allergy 32: 563-570.
18. Sashihara T, Sueki N, Ikegami S (2006) An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. J Dairy Sci 89: 2846-2855.
19. Segawa S, Hayashi A, Nakakita Y, Kaneda H, Watari J, et al. (2008) Oral administration of heat-killed Lactobacillus brevis SBC8803 ameliorates the development of dermatitis and inhibits immunoglobulin E production in atopic dermatitis model NC/Nga mice. Biol Pharm Bull 31: 884-889.
20. Yoshida T, Fujiwara W, Enomoto M, Nakayama S, Matsuda H, et al. (2013) An increased number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells induced by an oral administration of Lactobacillus plantarum NRIC0380 are involved in antiallergic activity. Int Arch Allergy Immunol 162: 283-289.
21. Shah MM, Saio M, Yamashita H, Tanaka H, Takami T, et al. (2012) Lactobacillus acidophilus strain L-92 induces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and suppresses allergic contact dermatitis. Biol Pharm Bull 35: 612-616.
22. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, et al. (2006) Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol Rev 212: 8-27.

23. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T (2009) Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21: 1105-1111.
24. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336.
25. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.
26. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, et al. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238.
27. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, et al. (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441: 231-234.
28. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA (2008) Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 223: 87-113.
29. Peluso I, Fina D, Caruso R, Stolfi C, Caprioli F, et al. (2007) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. *Infect Immun* 75: 1730-1737.
30. Yoshida A, Yamada K, Yamazaki Y, Sashihara T, Ikegami S, et al. (2011) *Lactobacillus gasseri* OLL2809 and its RNA suppress proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells through a MyD88-dependent signalling pathway. *Immunology* 133: 442-451.

31. Li CY, Lin HC, Lai CH, Lu JJ, Wu SF, et al. (2011) Immunomodulatory effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on both murine and human mitogen-activated T cells. *Int Arch Allergy Immunol* 156: 128-136.
32. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Magro CM, St Clair EW, et al. (2008) B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev* 223: 284-299.
33. Dong C, Davis RJ, Flavell RA (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20: 55-72.
34. Hayden MS, Ghosh S (2011) NF- $\kappa$ B in immunobiology. *Cell Res* 21: 223-244.
35. Pagès G, Guérin S, Grall D, Bonino F, Smith A, et al. (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286: 1374-1377.
36. Melino M, Hii CS, McColl SR, Ferrante A (2008) The effect of the JNK inhibitor, JIP peptide, on human T lymphocyte proliferation and cytokine production. *J Immunol* 181: 7300-7306.
37. Gerondakis S, Grumont RJ, Banerjee A (2007) Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol Cell Biol* 85: 471-475.
38. Khiem D, Cyster JG, Schwarz JJ, Black BL (2008) A p38 MAPK-MEF2C pathway regulates B-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17067-17072.

39. Yasui H, Kiyoshima J, Hori T (2004) Reduction of influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 675-679.
40. Maeda N, Nakamura R, Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, et al. (2009) Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. *Int Immunopharmacol* 9: 1122-1125.
41. Jounai K, Ikado K, Sugimura T, Ano Y, Braun J, et al. (2012) Spherical lactic acid bacteria activate plasmacytoid dendritic cells immunomodulatory function via TLR9-dependent crosstalk with myeloid dendritic cells. *PLoS One* 7: e32588.
42. Park JH, Um JI, Lee BJ, Goh JS, Park SY, et al. (2002) Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cell Immunol* 219: 22-27.
43. Park JH, Lee Y, Moon E, Seok SH, Cho SA, et al. (2005) Immunoenhancing effects of a new probiotic strain, *Lactobacillus fermentum* PL9005. *J Food Prot* 68: 571-576.
44. Vinderola G, Perdigon G, Duarte J, Farnworth E, Matar C (2006) Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine* 36: 254-260.

45. Galdeano CM, Perdigon G (2006) The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol* 13: 219-226.
46. Galdeano CM, de Leblanc Ade M, Carmuega E, Weill R, Perdigon G (2009) Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. *J Dairy Res* 76: 446-454.
47. Conley ME, Delacroix DL (1987) Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? *Ann Intern Med* 106: 892-899.
48. Mestecky J, Russell MW, Jackson S, Brown TA (1986) The human IgA system: a reassessment. *Clin Immunol Immunopathol* 40: 105-114.
49. Fagarasan S (2008) Evolution, development, mechanism and function of IgA in the gut. *Curr Opin Immunol* 20: 170-177.
50. Burt RW JR (1999) Polyposis syndromes. In: T Yamada DA, L Laine, C Owyang, D Powell, editor. *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins pp. 1995-2022.
51. Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Imaoka A, Itoh K (1999) Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. *Infect Immun* 67: 3504-3511.

52. Talham GL, Jiang HQ, Bos NA, Cebra JJ (1999) Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infect Immun* 67: 1992-2000.
53. Shroff KE, Meslin K, Cebra JJ (1995) Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* 63: 3904-3913.
54. Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, Tsuda M, Hachimura S, et al. (2009) *Bacteroides* induce higher IgA production than *Lactobacillus* by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in B cells in murine Peyer's patches. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 372-377.
55. Coombes JL, Powrie F (2008) Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8: 435-446.
56. Fayette J, Durand I, Bridon JM, Arpin C, Dubois B, et al. (1998) Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells in vitro. *Scand J Immunol* 48: 563-570.
57. Massacand JC, Kaiser P, Ernst B, Tardivel A, Burki K, et al. (2008) Intestinal bacteria condition dendritic cells to promote IgA production. *PLoS One* 3: e2588.
58. Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K (2010) Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol* 28: 243-273.

59. Sasaki M, Bosman BW, Tan PS (1995) Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *J Dairy Res* 62: 601-610.
60. Tan PS, Sasaki M, Bosman BW, Iwasaki T (1995) Purification and Characterization of a Dipeptidase from *Lactobacillus helveticus* SBT 2171. *Appl Environ Microbiol* 61: 3430-3435.
61. Sasaki M, Bosman BW, Tan PS (1996) A new, broad-substrate-specificity aminopeptidase from the dairy organism *Lactobacillus helveticus* SBT 2171. *Microbiology* 142: 799-808.
62. Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T (2000) Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J Dairy Sci* 83: 1434-1440.
63. Higurashi S, Kunieda Y, Matsuyama H, Kawakami H (2007) Effect of cheese consumption on the accumulation of abdominal adipose and decrease in serum adiponectin levels in rats fed a calorie dense diet. *Int Dairy J* 17: 1224-1231.
64. Walther B, Schmid A, Sieber R, Wehrmüller K (2008) Cheese in nutrition and health. *Dairy Sci Technol* 88: 389-405.
65. Usman, Hosono A (1999) Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J Dairy Sci* 82: 243-248.
66. Fujiwara S, Seto Y, Kimura A, Hashiba H (2001) Establishment of orally-administered *Lactobacillus gasseri* SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. *J Appl Microbiol* 90: 343-352.



67. Takahashi H, Fujita T, Suzuki Y, Benno Y (2006) Monitoring and survival of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in the human intestinal tract. *Microbiol Immunol* 50: 867-870.
68. Kajimoto O HH, Aoe S, Takahoshi T, Suzuki Y, Tanaka H (2002) Fermented milk containing *Lactobacillus gasseri* (SP strain) decreases serum cholesterol concentration in men with boundary and mild hypercholesterolemia. *Jpn J Lactic acid Bacteria* 13: 114-124.
69. Sato M, Uzu K, Yoshida T, Hamad EM, Kawakami H, et al. (2008) Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr* 99: 1013-1017.
70. Hamad EM, Sato M, Uzu K, Yoshida T, Higashi S, et al. (2009) Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *Br J Nutr* 101: 716-724.
71. Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, et al. (2010) Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 64: 636-643.
72. Nakayama Y, Moriya T, Sakai F, Ikeda N, Shiozaki T, et al (2014) Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective for preventing influenza in mice. *Sci Rep* 4: 4638.
73. Kadooka Y, Tominari K, Sakai F, Yasui H (2012) Prevention of rotavirus-induced diarrhea by preferential secretion of IgA in breast milk via

maternal administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 55: 66-71.

74. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, et al (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98: 694-702.

75. Mchenga SS, Wang D, Li C, Shan F, Lu C (2008) Inhibitory effect of recombinant IL-25 on the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice. *Cell Mol Immunol* 5: 425-431.

76. Borish L (1998) IL-10: evolving concepts. *J Allergy Clin Immunol* 101: 293-297.

77. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, et al. (2005) Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-1132.

78. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, et al. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-1141.

79. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S (2010) Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 30: 80-89.

80. Ito R, Kita M, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, et al. (2008) Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 12-16.

81. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Kuroda M, Kokura S, et al. (2004) Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. *Int J Mol Med* 14: 191-196.
82. Takenoshita S, Fukushima T, Kumamoto K, Iwadate M (2002) The role of TGF-beta in digestive organ disease. *J Gastroenterol* 37: 991-999.
83. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24: 99-146.
84. Dignass AU, Podolsky DK (1993) Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* 105: 1323-1332.
85. Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, et al. (2001) Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 49: 190-198.
86. Holmén N, Lundgren A, Lundin S, Bergin AM, Rudin A, et al. (2006) Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 12: 447-456.
87. Kelsen J, Agnholt J, Hoffmann HJ, Rømer JL, Hvas CL et al. (2005) FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties can be cultured from colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 141: 549-557.
88. Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *J Immunol* 171: 5012-5017.

89. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F (2003) Cutting edge: cure of colitis by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 170: 3939-3943.
90. Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, et al. (2004) Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 173: 6526-6531.
91. Ameho CK, Adjei AA, Harrison EK, Takeshita K, Morioka T, et al. (1997) Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* 41: 487-493.
92. Uchida M, Mogami O, Matsueda K (2007) Characteristic of milk whey culture with *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 and its application to the inflammatory bowel disease therapy. *Inflammopharmacology* 15: 105-108.
93. Bassaganya-Riera J, Hontecillas R (2010) Dietary conjugated linoleic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13: 569-573.
94. Yamashita M, Ukibe K, Uenishi H, Hosoya T, Sakai F, et al. (2014) *Lactobacillus helveticus* SBT2171, a cheese starter, regulates proliferation and cytokine production of immune cells. *J Dairy Sci* 97: 1-8.
95. Kanayama M, Morimoto J, Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, et al. (2011)  $\alpha 9\beta 1$  integrin-mediated signaling serves as an intrinsic regulator of pathogenic Th17 cell generation. *J Immunol* 187: 5851-5864.

96. Gururajan M, Chui R, Karuppannan AK, Ke J, Jennings CD, et al. (2005) c-Jun N-terminal kinase (JNK) is required for survival and proliferation of B-lymphoma cells. *Blood* 106: 1382-1391.
97. Wada T, Joza N, Cheng HY, Sasaki T, Kozieradzki I, et al. (2004) MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol* 6: 215-226.
98. Th'ng JP, Wright PS, Hamaguchi J, Lee MG, Norbury CJ, et al. (1990) The FT210 cell line is a mouse G2 phase mutant with a temperature-sensitive CDC2 gene product. *Cell* 63: 313-324.
99. Ichijo H (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 18: 6087-6093.
100. Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-252.
101. Jochum W, Passegué E, Wagner EF (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20: 2401-2412.
102. van Gent M, Griffin BD, Berkhoff EG, van Leeuwen D, Boer IG, et al. (2011) EBV lytic-phase protein BGLF5 contributes to TLR9 downregulation during productive infection. *J Immunol* 186: 1694-1702.
103. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171: 6173-6177.

104. Ryuichi Takiguchi MM, Eisuke Mochizuki, Yutaka Suzuki, Ryouji Kageyama, and Hisakazu Iino (1998) Effect of fermented-milk administration of defecation and fecal microflora of healthy volunteers. *Journal of Intestinal Microbiology* 11: 117-122.
105. Coffman RL, Lebman DA, Shrader B (1989) Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 170: 1039-1044.
106. Sonoda E, Matsumoto R, Hitoshi Y, Ishii T, Sugimoto M, et al. (1989) Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med* 170: 1415-1420.
107. Reuter G (2001) The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol* 2: 43-53.
108. Nakanishi Y, Hosono A, Hiramatsu Y, Kimura T, Nakamura R, et al. (2005) Characteristic Immune Response in Peyer's Patch Cells Induced by Oral Administration of *Bifidobacterium* Components. *Cytotechnology* 47: 69-77.
109. Harata G, He F, Kawase M, Hosono A, Takahashi K, et al. (2009) Differentiated implication of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 to immune responses of murine Peyer's patch. *Microbiol Immunol* 53: 475-480.
110. Perdigon G, Fuller R, Raya R (2001) Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr Issues Intest Microbiol* 2: 27-42.

111. Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, et al. (2002) Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 298: 1424-1427.
112. Kawamoto S, Tran TH, Maruya M, Suzuki K, Doi Y, et al. (2012) The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* 336: 485-489.
113. Suzuki K, Meek B, Doi Y, Muramatsu M, Chiba T, et al. (2004) Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1981-1986.
114. Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, Charbonnel N, Alame J, et al. (2011) Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PLoS One* 6: e18735.
115. Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Ben Younes A, Chareyre F, et al. (2007) A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS One* 2: e313.
116. Mora JR, Iwata M, Eksteen B, Song SY, Junt T, et al. (2006) Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 314: 1157-1160.
117. Feng T, Cong Y, Qin H, Benveniste EN, Elson CO (2010) Generation of mucosal dendritic cells from bone marrow reveals a critical role of retinoic acid. *J Immunol* 185: 5915-5925.
118. Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, et al. (2005) TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 201: 35-39.

119. Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, et al. (1999) BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 285: 260-263.
120. Kanswal S, Katsenelson N, Selvapandiyan A, Bram RJ, Akkoyunlu M (2008) Deficient TACI expression on B lymphocytes of newborn mice leads to defective Ig secretion in response to BAFF or APRIL. *J Immunol* 181: 976-990.
121. He B, Santamaria R, Xu W, Cols M, Chen K, et al. (2010) The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol* 11: 836-845.
122. Sashihara T, Sueki N, Ikegami S (2006) An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *J Dairy Sci* 89: 2846-2855.
123. Kim HA, Jeon SH, Seo GY, Park JB, Kim PH (2008) TGF-beta1 and IFN-gamma stimulate mouse macrophages to express BAFF via different signaling pathways. *J Leukoc Biol* 83: 1431-1439.
124. Bobr A, Igyarto BZ, Haley KM, Li MO, Flavell RA, et al. (2012) Autocrine/paracrine TGF-beta1 inhibits Langerhans cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10492-10497.
125. Kaplan DH, Li MO, Jenison MC, Shlomchik WD, Flavell RA, et al. (2007) Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 204: 2545-2552.



126. Belladonna ML, Volpi C, Bianchi R, Vacca C, Orabona C, et al. (2008) Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *J Immunol* 181: 5194-5198.
127. Honda K, Littman DR (2012) The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol* 30: 759-795.